

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE
Carnobacterium maltaromaticum EN TRUCHAS
ARCOÍRIS (Oncorhynchus mykiss) DE CULTIVO
EN EL DEPARTAMENTO DE JUNÍN**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Taneo Chiroque Limaymanta

Lima – Perú

2014

DEDICATORIA

A Kelly...

*Por la sencilla razón, de ser
En todo aspecto y por mucho,
La mejor persona que conozco.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Magna y Segundo, por haber sido los mayores influyentes en mi vida personal y profesional, y enseñarme que ambas deben crecer a la par, y que jamás debemos olvidar nuestros orígenes, quienes somos, los Chiroque de Talara y los Limaymanta de Huacrapuquio.

A mi hermana Magnita por enseñarme el sendero, el mejor sendero, ser sanmarquino y a mi hermano Yin por seguirlo también y porque, sin percatarse de ello quizá, a diario aprendo mucho de ellos.

A todo el gran grupo humano del Laboratorio de Ictiopatología de mi querida facultad mil gracias, en especial a la Dra. Nieves, por ilustrarme con sus enseñanzas, además de demostrarme su incommensurable amabilidad y comprensión.

Al gran equipo de la Subdirección de Insumos Pecuarios del SENASA, por permitirme servir a mi país y a la vez poder desarrollarme profesionalmente, a todos ustedes, mi gratitud.

A la familia que elegí, a los viejos y nuevos amigos, en especial a mi promoción, la Casa Gris por todos los momentos compartidos y las lecciones aprendidas.

Y para terminar esta página de la mejor manera... gracias Kelly, por tu ayuda desmedida a lo largo de todos estos años, por ser quien despierta lo mejor de mí, por ser mi mejor amiga y por enseñarme una nueva forma de felicidad.

ÍNDICE

RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ANEXOS	xx
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA	3
2.1.1. Acuicultura mundial	3
2.1.2. Acuicultura nacional	5
2.2. TRUCHA ARCOÍRIS	
2.2.1. Clasificación Taxonómica	7
2.2.2. Características Anatómicas	8
2.3. EL AGENTE	
2.3.1 Carnobacterium spp	
2.3.1.1 <i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	12
2.3.1.1.1.Taxonomía	13
2.3.1.1.2.Especies afectadas y distribución geográfica	14
2.3.1.1.3.Características de <i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	14
2.3.1.1.4. Carnobacteriosis	14
2.3.1.1.5.Signos clínicos	15
2.3.1.1.6. Diagnóstico	15
2.3.1.1.7.Patogenia e inmunidad	16
2.3.1.1.8. Control y tratamiento	17

III.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1.	Lugar de Estudio	18
3.2.	Material de laboratorio	18
3.3.	Material biológico	18
3.4.	Tamaño Muestral	18
3.5.	Metodología	19
3.5.1.	Evaluación Físico- Química del agua	19
3.5.2.	Toma de muestras biológicas	20
3.5.3.	Siembra y cultivo bacteriano	21
3.6.	Caracterización de colonias	21
3.7.	Mantenimiento de cepas	22
3.8.	Caracterización bioquímica	22
IV.	RESULTADOS	23
4.1.	Análisis de Agua	23
4.2.	Examen de Necropsia	23
4.2.1.	Lesiones Externas	23
4.2.2.	Lesiones Internas	28
4.3	Análisis Microbiológico	33
V.	DISCUSIÓN	36
VI.	CONCLUSIONES	41
VI.	RECOMENDACIONES	42
VII.	BIBLIOGRAFÍA	43
VIII.	ANEXOS	49

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo, el aislamiento e identificación de la bacteria *Carnobacterium maltaromaticum*, que produce la enfermedad llamada “pseudo BKD”, debido a la similitud de lesiones macroscópicas, específicamente en riñón y bazo, con la Enfermedad Bacteriana del Riñón o BKD (por sus siglas en inglés) causada por el *Renibacterium salmoninarum*. Se muestrearon truchas arcoíris (*Onchorhynchus mikiss*) en múltiples etapas de producción en un centro piscícola ubicado en la región Junín. Se presumía la presencia de este patógeno en dicho centro pues en anteriores estudios (Janampa, 2012) se evidenciaron lesiones en riñón y bazo, sin embargo no se logró determinar la presencia del *Renibacterium salmoninarum*. Se seleccionaron 60 truchas con signos clínicos que evidenciaban enfermedad como son aislamiento del cardumen, exoftalmia, melanosis cutánea, abdomen dilatado; a las cuales se les realizó el examen macroscópico externo e interno, que permitió evidenciar otras alteraciones macroscópicas externas inespecíficas como branquias congestionadas y úlceras en la piel e internas como esplenomegalia, hepatomegalia, palidez hepática, renomegalia, hemorragias petequiales en hígado y ciegos pilóricos. Se sembraron hisopados tomados del riñón y bazo en agar TSA (Trypticase soya agar), se seleccionaron siete colonias posibles, se realizó una batería de 17 pruebas bioquímicas identificándose que todas ellas pertenecen a la familia *Carnobacteriaceae* y que una de éstas corresponde a *Carnobacterium maltaromaticum*; estando estas implicadas en la alteración de la salud de los peces muestreados.

Palabras clave: *Renibacterium salmoninarum*, *Carnobacterium maltaromaticum*, trucha arcoíris.

ABSTRACT

The present study aimed at the isolation and identification of bacteria *Carnobacterium maltaromaticum*, which produces the disease called "pseudo BKD" due to the similarity of gross lesions, specifically in kidney and spleen, with Bacterial Kidney Disease, or BKD (for its acronym in English), caused by *Renibacterium salmoninarum*. Rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*) were sampled at multiple stages in farm production center located in the Junín region. The presence of the pathogen at the center as in previous studies (Janampa, 2012) was assumed in kidney and spleen lesions were evident, however not able to determine the presence of *Renibacterium salmoninarum*. Sixty trout were selected clinical signs which showed disease, which underwent external and internal gross examination, these exhibited external macroscopic alterations nonspecific, such as exophthalmos, cutaneous melanosis, distended abdomen, gills congested, and skin ulcers and internal and splenomegaly, hepatomegaly, hepatic pallor, renomegaly, petechial hemorrhages in the liver and pyloric caeca. Kidney and spleen samples agar TSA (trypticase soy agar) were sown five possible colonies battery of biochemical identifying that they all belong to the family *Carnobacteriaceae* and one of them corresponds to *Carnobacterium maltaromaticum*; these being involved in the impairment of health of the fish sampled.

Keywords: *Renibacterium salmoninarum*, *Carnobacterium maltaromaticum*, rainbow trout

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1.** Evolución de la producción de la Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)
- Cuadro 2.** Clasificación Taxonómica de la Trucha arcoíris
- Cuadro 3.** Clasificación Taxonómica de la bacteria *Carnobacterium maltaromaticum*.
- Cuadro 4.** Parámetros de la calidad de agua
- Cuadro 5.** Parámetros de la calidad de agua- resultados
- Cuadro 6.** Lesiones externas halladas en truchas arcoíris.
- Cuadro 7.** Lesiones/ Hallazgos internos encontrados en trucha arcoíris.
- Cuadro 8.** Resultados Pruebas Bioquímicas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de la Producción de Trucha Arcoíris a Nivel Mundial (2000- 2010)

Figura 2. Producción mundial de Trucha Arcoíris a nivel mundial en TM (2009- 2010)

Figura 3. Lesiones en piel. Normal (A), Melanosis (B)

Figura 4. Exoftalmia(A), Opacidad ocular (B), Hipema (C), Descomposición de aleta caudal (D), Ulcera lateral en piel (E).

Figura 5. Distensión abdominal.

Figura 6. Palidez branquial (Flechas rojas)

Figura 7. A: Palidez hepática (Flecha verde), Esplenomegalia (Flecha blanca), B: Congestión de ciegos pilóricos (Flechas negras), Congestión y dilatación del Intestino posterior (Flecha azul), Renomegalia (Flecha blanca).

Figura 8. Atrofia del tejido graso peritoneal.

Figura 9. Congestión del tejido graso peritoneal.

Figura 10. Distensión estomacal.

Figura 11. Lesiones compatibles con granulomas en riñón.

Figura 12. A: Hemorragia equimótica en hígado (Flechas rojas), B: Hemorragia petequial en ciegos pilóricos (Flechas verdes), Hemorragia petequial en tejido graso peritoneal (Flechas negras).

Figura 13. Lesiones compatibles con granulomas en hígado.

Figura 14. Colonia presuntivas de *Carnobacterium sp.*

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Fundamento de Pruebas Bioquímicas.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Del inglés: “Food and Agriculture Organization”)
- **OIE:** Organismo Mundial de la Sanidad Animal (Del inglés: “World Organization for Animal Health”)
- **PRODUCE:** Ministerio de la Producción.
- **TM:** Toneladas métricas.
- **CPI:** Centro Piscícola “El Ingenio”
- **TSA:** Agar Soya Tripticasa (Del inglés: “Trypticasa Soja Agar”)
- **TSB:** Caldo Soya Tripticasa

I. INTRODUCCIÓN

La acuicultura presenta un crecimiento superior que cualquier otro sector de producción de alimentos de origen animal y su tasa de crecimiento en el mundo es del 8,8% anual desde 1970 (FAO, 2012). En el Perú el panorama acuícola es bastante prometedor, pues en los últimos 10 años este sector ha tenido un crecimiento sostenible llegando a superar las 90 000 TM según datos estadísticos del Ministerio de La Producción.

El cultivo de la trucha arcoíris es uno de los sectores que más se ha desarrollado llegando a exportar en el año 2010 la suma de 6 millones de dólares, convirtiéndose así en una actividad económica significativamente rentable y una importante fuente de trabajo para las localidades rurales (PRODUCE, 2011).

La acuicultura de trucha se viene difundiendo en distintas zonas del Perú, pero Junín, Huancavelica, Lima, Pasco y Puno son los departamentos que han mostrado mayor volumen de producción, esto debido a que las condiciones medio ambientales de crianza son las más adecuadas para su crianza. Sin embargo, como en toda crianza animal, la intensificación de la producción, conlleva al estrés y la aparición de enfermedades de distintos agentes que hasta el momento se mantenían de manera subclínica (PRODUCE, 2011).

En nuestro país, a pesar de tener una producción en franco crecimiento, el conocimiento sobre el estado sanitario en el que se encuentra la crianza de truchas de las distintas zonas de cultivo no es conocido totalmente. Esta situación es aún más riesgosa si se toma en cuenta que muchas piscigranjas utilizan ovas importadas de países donde múltiples enfermedades ya han sido reportadas (PRODUCE, 2010).

El presente estudio se realizó en una piscigranja de Junín y se muestrearon 60 truchas con signos de enfermedad (melanosis, exoftalmia, lordosis, aislamiento del cardumen etc). Estudios anteriores realizados en esta piscigranja, evidenciaron la presencia de lesiones en riñón e hígado, presumiéndose la presencia del *Renibacterium*

salmoninarum, agente causante de la *enfermedad bacteriana del riñón* conocida como BKD por sus siglas en inglés (Bacterial Kidney Disease) sin embargo no se logró determinar la presencia de este agente, lo que hizo suponer que las lesiones en estos órganos fueron causadas por el *Carnobacterium maltaromaticum*, agente causante de la enfermedad conocida como Pseudo- BKD, por la similitud de las lesiones en este órgano. Luego de la siembra en placas y selección de las colonias, además de pruebas bioquímicas se llegó a identificar a la bacteria *Carnobacterium maltaromaticum*, agente causante de la enfermedad conocida como Pseudo BKD.

La bacteria *Carnobacterium maltaromaticum* es bacilar, grampositiva, estudiada ampliamente por su capacidad de producir citoquinas antagónicas a *Listeria monocytogenes*. Pero también ha sido indicada como la causante de importantes casos de mortalidad en Europa y Sudamérica.

La importancia de la identificación de esta bacteria radica en las expectativas sociales y económicas que genera la piscicultura sobretodo de la trucha, que hace necesario realizar investigaciones que permitan identificar enfermedades infecciosas que afecten la producción y a través de ello plantear protocolos de diagnóstico e inspección, además de lineamientos para crear sólidos programas de sanidad que permitan una crianza sostenible y de libre exportación.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA

2.1.1. Acuicultura mundial

La acuicultura se define como el desarrollo de especies acuáticas en medios naturales o artificiales manejados por el hombre con la finalidad de sustento o comercial. La mayor parte de los emprendimientos en acuicultura están basados en los cultivos de animales acuáticos sean estos invertebrados o vertebrados. Como organismos acuáticos, se consideran aquellos cuya reproducción (fase originaria del ciclo vital) depende fundamentalmente del agua (medio en que pueden vivir durante toda su vida o parcialmente). La acuicultura en su sentido más amplio, se define como el conjunto de actividades encaminadas al cultivo de especies acuáticas. La producción, crecimiento y comercialización de organismos de aguas dulces o saladas, útiles para el hombre y/o animales, constituyen por lo tanto, los fines de este tipo de proceso.

De todos los organismos acuáticos, los peces son los más cultivados desde hace miles de años existiendo una amplia gama de especies que son sometidas actualmente a cautiverio para realizar una producción con mayor control (Bocek, 2007).

La pesca de captura y la acuicultura suministraron al mundo unos 142 millones de toneladas de pescado en el 2008. De ellos, 115 millones de toneladas se destinaron al consumo y proporcionaron un suministro per cápita aparente aproximado de 17 kg (equivalente en peso vivo), lo cual constituye un máximo histórico. La acuicultura generó el 46 % del suministro total de pescado comestible, es decir, tres puntos porcentuales más que en el año 2006 (FAO, 2010).

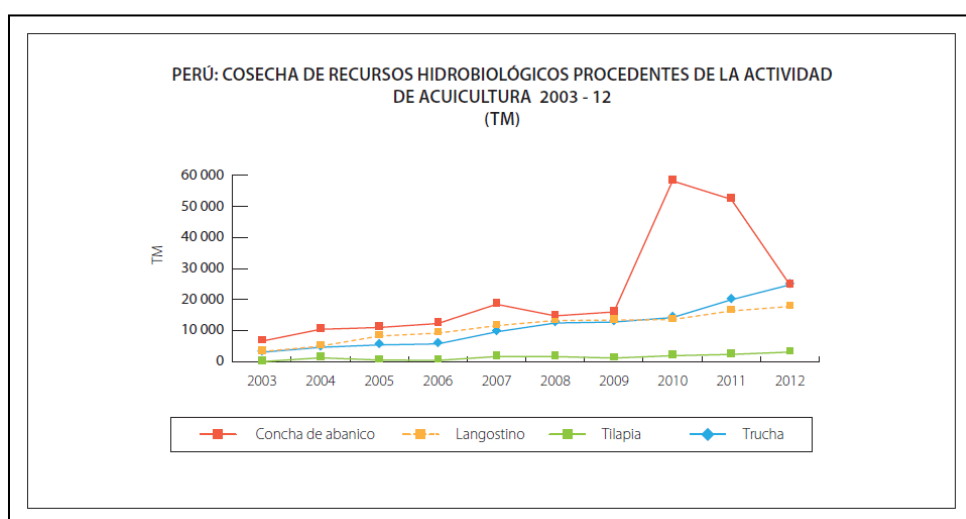
En 2007 el pescado representó el 15,7% del aporte de proteínas animales de la población mundial y el 6,1% de todas las proteínas consumidas. En el ámbito mundial el pescado proporciona a más de 1 500 millones de personas cerca del 20 % de su aporte medio per cápita de proteínas animales y a 3 000 millones de personas al menos el 15 % de dichas proteínas.

China sigue siendo, con mucho, el mayor productor de pescado con 47,5 millones de toneladas en 2008 (32,7 y 14,8 millones de toneladas procedentes de la acuicultura y la pesca de captura, respectivamente).

En las tres últimas décadas (1980-2010), la producción mundial de peces comestibles procedentes de la acuicultura se ha multiplicado por 12, a un índice medio anual del 8,8 por ciento. La producción acuícola mundial alcanzó otro máximo histórico en 2010 (Cuadro N° 1), correspondiente a 60 millones de toneladas (excluidas las plantas acuáticas y los productos no alimentarios), con un valor total estimado de 119000 millones de dólares americanos (FAO, 2012).

La trucha arcoíris ha tenido un interesante crecimiento desde el año 2003 en donde se registraron 3111 TM y que para el año 2012 alcanzó las 24762 mil TM, (Cuadro 1) representando un crecimiento continuo sobre la acuicultura de esta especie (PRODUCE, 2013).

Cuadro 1. Evolución de la Producción de Trucha Arcoíris a Nivel Mundial (2000-2012).



Fuente: PRODUCE – 2013

Entre los principales países productores de trucha arco iris en 2010 se tiene en primer lugar a Chile con el 24,39 % de la producción mundial, seguido por Noruega con el 13,27 % e Irán con el 11,03 %. En menor escala también destacan países como por Italia (6,66%), Francia (5,68%), Dinamarca (5,54%), Alemania (3,88%), España (3,78%), China (2,95 %), Polonia (2,91%), EEUU de Norteamérica (2,86%) y Perú (2,46 %) (PRODUCE, 2011).

El empleo en el sector pesquero ha aumentado más rápidamente que el empleo en la agricultura tradicional. La mayoría de los pescadores y los acuicultores viven en países en desarrollo, principalmente en Asia, continente que ha experimentado el mayor incremento en las últimas décadas, lo que es reflejo en particular de la rápida expansión de las actividades acuícolas. China es el país con el mayor número de pescadores y acuicultores, y en su conjunto constituyen cerca de una tercera parte del total mundial (FAO, 2012).

2.1.2 Acuicultura Nacional

La trucha arcoíris es la especie pionera en el desarrollo cronológico de la acuicultura en el Perú, es así que en 1928 se importó 50,000 ovas embrionadas procedentes de los EE.UU. a un criadero particular en la Oroya, comenzando una política de repoblamiento de aguas andinas, desde entonces la crianza de truchas se fue convirtiendo a una de las principales especies de cultivo en el Perú (Godoy, 2002).

En el escenario mundial, Perú con el nivel de cosecha proveniente de la acuicultura registrada en el año 2010 (89 021 TM), ubicándose en el puesto N° 27 de los países que realizan acuicultura y se encontraría aún muy por debajo de los niveles de cosecha de otros países de la región americana como son Chile, Brasil, México, Ecuador, Canadá y EEUU de Norteamérica (FAO, 2012).

La producción de truchas en el Perú en los últimos años ha crecido significativamente. Las condiciones medioambientales de las zonas alto andinas y la presencia de recursos hídricos de óptimas condiciones para esta actividad acuícola han favorecido dicho crecimiento (PRODUCE 2010).

La trucha es una especie que se ha adaptado eficientemente a las zonas alto andinas y actualmente se viene criando a nivel comercial en toda la sierra peruana, predominando en su producción las regiones de Puno y Junín, su comercialización se realiza tanto en el mercado nacional e internacional, otorgándole un reconocimiento a la calidad de la trucha que se produce en nuestro país (PRODUCE, 2010).

La Región Junín ubicada en la sierra central del Perú se ha caracterizado en los últimos años como una región productora de truchas “Arcoíris”, especie que tiene una fuerte demanda en Canadá, Noruega Suecia, Alemania, y los estados Unidos (ADEX, 2008).

La exportación de trucha se ha convertido ya en una actividad comercial significativamente rentable y viene creciendo vertiginosamente, ya que en el 2010 se alcanzó la suma de 6 millones de dólares en exportación aproximadamente (PRODUCE, 2011).

Las enfermedades producidas en los peces de cultivo son la amenaza más temida por los acuicultores. Catástrofes ocurridas en la industria de la acuicultura incluyen la propagación de la mancha blanca en cultivos de camarón, en Ecuador y otros países de América Latina, y casos más recientes el caso de la Anemia Infecciosa del salmón, que perjudicó en sobremanera a la industria salmonera en Chile (De Silva y Soto, 2009).

A excepción de *Renibacterium salmoninarum*, las enfermedades producidas por bacterias grampositivas han recibido siempre un menor grado de atención comparadas con ictiopatógenos gramnegativos clásicos, tales como *Yersinia* o *Aeromonas*, por considerarse que su impacto económico y sanitario en la producción piscícola era poco relevante. Sin embargo, los procesos septicémicos ocasionados por cocos y cocobacilos grampositivos, son ahora patologías de gran importancia en la acuicultura marina y continental, debido a su aumento notable, tanto en la frecuencia de presentación como en la virulencia con la que se manifiestan, produciendo graves repercusiones económicas para los piscicultores (Vendrell *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta la importancia económica que representa actualmente la truchicultura en el Perú es necesario conocer la importancia sanitaria y económica de las enfermedades causadas por bacterias tanto gramnegativas así como grampositivos.

En el 2012 se reporta la presencia de bacterias grampositivas, las cuales fueron aisladas de riñón y bazo de truchas enfermas, estas bacterias no fueron identificadas pero se evidenció la importancia que tienen éstas en los problemas sanitarios acuícolas. (Baca, 2012; Fernández, 2012).

2.2 TRUCHA ARCOÍRIS

2.2.1 Clasificación Taxonómica

La trucha arco iris fue nombrada como *Salmo gairdneri* por Richardson en 1836, pero actualmente adopta la denominación inicial de *Oncorhynchus mykiss* propuesta por Walbaum en 1792 (Behnke, 1966). Su clasificación taxonómica se aprecia en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Clasificación Taxonómica de la Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Reino	Animalia
Sub- reino	Metazoa
Phylum	Chordata
Clase	Osteichthyes
Orden	Isospondyli
Sub- orden	Salmoneidei
Familia	Salmonidae
Género	Oncorhynchus
Especie	Oncorhynchus mykiss
Nombre común	Trucha arcoíris

Fuente: Smith and Sterley, 1999

2.2.2 Características anatómicas

2.2.2.1 Sistema tegumentario

La piel es el revestimiento, en caso de peces cubierto por escamas, lo cual en la trucha arcoíris se distingue generalmente por sus manchas más pequeñas, escamas de menor tamaño, moteado más abundante de la cola, aletas y línea iridiscente en la parte inferior de cada lado que se evidencia con determinadas luces (Roberts y Shepherd, 1974), la epidermis tiene la función de mantener separados el agua exterior de los líquidos tisulares, posee pequeñas glándulas y células caliciformes, dichas glándulas secretan un moco viscoso que reviste al pez con un líquido resbaladizo protector y antiinfeccioso. Debajo de la epidermis se hallan las escamas donde se desarrollan en la fase alevina a medida que crece el pez crecen las escamas mas no el numero en la época de fresa (época donde las hembras empiezan a desovar). Sobre las escamas se hallan células pigmentadas (Melanóforos o cromatóforos o células oscuras que producen la coloración característica del pez). Cuando un pez se debilita por enfermedad, adquiere con frecuencia un color más oscuro (Roberts y Shepherd 1974; Hibiya, 1982 Cépeda y Oróstegui 2000; Iregui, 2008).

2.2.2.2 Sistema muscular

Los principales músculos se encuentran en serie de bloques, esta disposición determina una considerable fuerza de impulsión, estos paquetes o bloques se fijan directamente a la columna vertebral haciéndolo más flexible (Roberts y Shhepherd, 1974).

2.2.2.3 Sistema respiratorio

Los peces respiran mediante branquias, un sistema de cuatro series de tubos muy finos a ambos lados de la garganta, al atravesar las branquias, la sangre cede CO₂ al agua y obtiene oxígeno de ella, por medio de la pared branquial (laminillas branquiales), estas laminillas deben ser muy finas para que el O₂ y el CO₂ puedan intercambiarse con facilidad, también contienen células productoras de moco, las branquias son muy

vulnerables a las injurias causadas por el agua (Roberts y Shepherd, 1974). Las branquias tienen un área de contacto con el medio acuático muy extenso, hasta diez veces el resto del cuerpo (Iregui, 2008). Posee cinco pares de arcos branquiales, pero solo los cuatro primeros poseen filamentos, del borde externo convexo de cada arco branquial se originan dos hemibranquias, de las cuales se desprenden los filamentos y a ambos lados de cada filamento se originan las lamelas que le dan a cada filamento la apariencia de un pino. En el lado interno cóncavo del arco branquial, la superficie que da hacia la faringe del pez, posee prolongaciones a manera de espinas, que representan una especie de filtro que protege las lamelas branquiales del alimento o del detritus acuático. (Hibiya, 1982, Ferguson, 2006; Iregui, 2008).

2.2.2.4 Sistema circulatorio

El corazón posee cuatro cámaras, la cual bombea sangre al ventrículo triangular, que proporciona la presión suficiente para irrigar al interior del cono arterioso y a su vez difundirlo por todo el organismo. El corazón filtra la sangre por las branquias por medio de oleadas que a su vez se distribuyen al resto del organismo para proporcionar O₂ a los tejidos (Roberts y Shepherd 1974).

2.2.2.5 Sistema digestivo

Se inicia por la boca posee dientes para capturar sus alimentos mas no para la masticación, una vez ingerido el alimento desciende por el esófago hasta el estómago (órgano en forma de u) que puede dilatarse fuertemente para contener grandes cantidades de alimentos, en el estómago el alimento se descompone mediante la cocción del ácido y las enzimas digestivas, posteriormente , es triturada por los músculos de su pared entre la porción posterior del estómago y del intestino delgado se presenta un grupo de sacos ciegos, que generalmente se hallan en un número de treinta a ochenta los cuales están cubierto por tejido adiposo blanco. Las enzimas desdoblan el alimento en azúcar, grasas y aminoácidos atravesando después la pared intestinal hasta llegar a la corriente sanguínea por medio del hígado, los alimentos restantes (fibra, cáscara), se van al intestino grueso y son posteriormente evacuados con las heces (Roberts y Shepherd, 1974). Microscópicamente el epitelio del estómago es estratificado cuboidal o columnar

y puede ser ciliado, con muchas células caliciformes. Se pueden encontrar glándulas multicelulares serosas o cardiales (Iregui, 2008).

Existen dos glándulas anexas asociadas a este sistema, una de ellas es el páncreas, órgano difuso a manera de fragmentos que circunda la grasa que rodea a los ciegos pilóricos, su principal función es la producción de enzimas e insulina que controla el metabolismo del azúcar del pez, este órgano es importante en las enfermedades víricas ya que es el lugar más importante de replicación de los virus más comunes en salmónidos (Rodríguez *et al.*, 2004 Iregui, 2008).

En cuanto al hígado, está situado delante del estómago, es de color pardo-rojizo, blando y friable (Roberts y Shepherd 1974; Ferguson 2006), cumple la función del metabolismo alimenticio ya que permite que moléculas del alimento, llevados a la sangre desde el intestino sean transformados en proteínas, grasas y carbohidratos. Microscópicamente el hígado es similar al de los otros vertebrados, es una glándula retículo-tubular cubierta por una membrana serosa. Los hepatocitos son células poligonales con núcleos esféricos, en peces comunes contienen cantidades considerables de lípidos y glucógeno (Ferguson, 2006; Iregui, 2008).

2.2.2.6 Sistema excretor

El riñón filtra la sangre por el glomérulo y lo conduce a través de los conductos del uréter desembocando en la vejiga. En los peces la mayor parte de los desechos nitrogenados son eliminados por el riñón, además de la función de osmoregulación que cumple también con las branquias (Iregui, 2008) el riñón de los salmónidos es un órgano largo de coloración negra, se extiende desde la parte posterior de la cabeza hasta el ano. En el riñón craneal se encuentra el tejido hematopoyético y algunos túbulos renales, a nivel caudal, se encuentra en mayor parte de las estructuras excretoras propias del órgano: las nefronas, cada nefrona se compone de una corpúsculo renal o glomérulo y de un sistema tubular, en esta región es muy escaso el tejido hematopoyético (Hibiya, 1982; Iregui, 2008).

2.2.2.7 Sistema Reproductor

Los órganos de los salmónidos consiste en ovarios para las hembras y testículos para los machos, el ovario se compone de células germinales el cual crece hasta el tamaño de un guisante. En la época de la fresa, la piel tanto del macho como de la hembra se engrosa, se hace más brillante y también se hincha la abertura urogenital, haciendo que los huevos sean expulsados al agua donde son esperados por el semen (producido por los testículos), formando una nube de células espermáticas vivas produciéndose la fertilización (Ellis *et al.*; 1983; Iregui, 2008).

2.3. EL AGENTE

2.3.1 *Carnobacterium spp*

Es un género atípico de *Lactobacillus* aislado comúnmente de carne envasada al vacío, de peces y de agua de mar (Collins *et al.*, 1987), este género se creó para incluir algunos microorganismos anteriormente clasificados como lactobacilos al estar filogenéticamente más próximos a los *Enterococos* y *Vagococos* son un grupo heterofermentativo, grampositivas, catalasa positiva, no son exigentes metabólicamente y son menos intolerantes al oxígeno, las especies de *Carnobacterium* se pueden diferenciar de los *Lactobacillus* por su capacidad de crecimiento a pH de 9, son psicrótrofos creciendo la mayoría a 0°C, mientras que a 45°C no crecen, algunas especies producen gas a partir de la glucosa. (Wood y Holpzafel, 1995).

Actualmente se conocen nueve especies de este género: *Carnobacterium alterfunditum*, *Carnobacterium funditum* (Franzmann *et al.*, 1991), *Carnobacterium gallinarum*, *Carnobacterium mobile* (Collins *et al.*, 1987), *Carnobacterium viridans*, *Carnobacterium pleistocenium*, *Carnobacterium divergens* (Holzapfel & Gerber, 1983; Collins *et al.*, 1987) *Carnobacterium inhibens* (Jo`born *et al.*, 1999) y *Carnobacterium maltaromaticum* (Hiu *et al.*, 1984; Shaw & Harding, 1985) donde solo estas tres últimas especies fueron aisladas de peces (Brener *et al* 2009).

2.3.1.1 *Carnobacterium maltaromaticum*

Existen pocos reportes de los *Lactobacillus spp.* como causante de enfermedades en peces, el primer trabajo de investigación fue realizado por Ross and Toth (1974), quienes describieron mortalidades en truchas arcoíris en piscigranjas de California. A la infección que produce esta bacteria también se le conoce con el término de enfermedad pseudo BKD (*bacterial kidney disease*) por su semejanza con las lesiones granulomatosas en el riñón de truchas afectadas por el *Renibacterium salmoninarum*, sin embargo no es tan clara la patología que ésta produce en el pez, pero se han reportado lactobacilos implicados en la infección de truchas hembras de 2-3 años de piscigranjas en Terranova, Canadá, aunque en ésta fue una infección mixta donde también se encontraron inicialmente lactobacilos, luego *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens* y algunas *Enterobacteriaceae* (Cone, 1982), sin embargo hasta ese entonces no habían reportes de patogenicidad primaria de esas cepas de lactobacilos, por ello es importante precisar el verdadero rol como patógeno de peces de esta bacteria.

Hiu *et al.* (1984), describe 17 aislamientos bacterianos obtenidos de salmón chinook y trucha arcoíris enfermos, denominándolos *Lactobacillus piscícola*, aislamientos similares fueron obtenidos de salmónidos juveniles y carpas en Bélgica y Francia (Michel *et al.*, 1986) además en lubina y pez gato en los EE.UU (Baya *et al.*, 1991).

Lactobacillus piscícola fue reclasificado como *Carnobacterium piscícola* (Collins *et al.*; 1987), además algunos lactobacilos patógenos de peces similares a *Lactobacillus alimentarius* y *Lactobacillus homohiochi*, se han aislado de la trucha arcoíris después del desove en los EE.UU (Starliper *et al.*; 1992). Finalmente, métodos modernos de clasificación taxonómica, dieron lugar a la reclasificación del este patógeno como *Carnobacterium maltaromaticum* (Mora *et al.*, 2003).

Asimismo, bacterias ácido lácticas fueron sido aislados de los riñones de truchas arcoíris moribundas, estas cepas produjeron enfermedad crónica tras la infección intraperitoneal en salmónidos (Austin y Austin, 2007).

Toranzo *et al* (1993), reportó la mortalidad súbita del 25% de las truchas en etapa comercial (de una población de 60 000), estas truchas presentaron signos clínicos externos como una marcada exoftalmia bilateral, hemorragias oculares, opacidad ocular, melanosis, abdomen distendido, e internos donde los más saltantes fueron la hemorragia petequial en hígado e intestinos, líquido mucoso en estómago, además lesiones compatibles con granulomas en hígado y riñón. Luego de la selección de las colonias por características fenotípicas y pruebas bioquímicas, se logró identificar al agente como *Carnobacterium maltaromaticum*. Se determinó que dicha infección fue causada por el estrés en los peces que fue generado por el aumento de temperatura del agua. Asimismo, Álvarez (1996) reportó alta mortalidad en truchas arcoíris en edad comercial en el estado de Mérida en los andes de Venezuela, donde los peces enfermos presentaron los mismos signos clínicos internos y externos que los reportados por Toranzo *et al.*, al presentar granulomas en riñón, el autor intentó inicialmente aislar al *Renibacterium salmoninarum*, no obteniendo los resultados esperados, pero pudo aislar *Lactobacillus* atípicos que luego de la realización de pruebas bioquímicas, se determinó que el agente causante de dicha patología era el *Carnobacterium maltaromaticum*.

2.3.1.1.1 Taxonomía

Carnobacterium maltaromaticum es una bacteria grampositiva responsable de la enfermedad pseudo BKD, que afecta a truchas arcoíris (Cuadro 4):

Cuadro 4. Clasificación Taxonómica de la bacteria *Carnobacterium maltaromaticum*

Clasificación Taxonómica	
Dominio	Bacteria
División	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Lactobacillales
Familia	Carnobacteriaceae
Genero	Carnobacterium
Especie	C. maltaromaticum

Fuente: NCBI, 2002

2.3.1.1.2 Especies afectadas y distribución geográfica.

Las bacterias que pertenecen al género *Lactobacillus* o *Carnobacterium* se han aislado de las siguientes especies con condiciones de enfermedad: la trucha arcoíris (Cone, 1982), la trucha de lago (*S. namaycush*) (Daly y Stevenson, 1986), trucha degollada (*S. clarki*) y salmón Chinook (*O. tshawytscha*) (Hiu , la trucha marrón (*S. trutta*) y la carpa, 1984 *et al.*) (Michel *et al.*, 1986), la lubina rayada (*M. saxatilis*) y SH catfi canal (Baya *et al.*, 1991).

La bacteria también ha sido aislada a partir siluros marrones (*I. nebulosus*), pero éstos no mostraron signos de enfermedad (Baya *et al.*; 1991). El *Carnobacterium maltaromaticum* está ampliamente distribuido, después de haber sido aislado en Canadá, EE.UU., Australia, Bélgica, Francia, España y Países de América Latina como Venezuela. (Cone, 1982; Hiu *et al.*, 1984; . Michel *et al.*, 1986.; Humphrey *et al.*, 1987).

2.3.1.1.3. Características de *Carnobacterium maltaromaticum*

En agar TSA (tripticasa de soja), esta bacteria produce colonias, pequeñas, brillantes enteras, circulares, a veces opacas, que crecen dentro de las 48 horas de incubación, son bacilos cortos grampositivos de aproximadamente 1.1-1.4 x 0.5-0.6 µm de tamaño, no presentan motilidad, otras características fenotípicas incluyen la incapacidad para producir catalasa, H₂S, indol, gelatinasa, ureasa, reacción de Voges Proskauer, hidrólisis de arginina, lisina u ornitina descarboxilasas, o reducir nitratos; sin embargo, los aislados producen ácido a partir de fructosa, galactosa, glucosa, glicerol, inulina, lactosa, maltosa, manitol, melibiosa, salicina, almidón, sacarosa y trehalosa, pero no rafinosa, sorbitol o xilosa (Schmidtke y Carson, 1994).

2.3.1.1.4. Carnobacteriosis

Una condición septicémica de peces conocida como pseu-enfermedad del riñón fue primero reportado por Ross y Toth (1974), por haber sido causado por *Lactobacillus sp.* Estos autores y Cone (1982) reportaron que la enfermedad estaba solamente en peces hembra. Cone (1982), informó que la enfermedad se producía en peces que no

habían perdido todos sus huevos después del desove. En este estudio se aisló la bacteria de riñón y líquido ascítico. La tinción de Gram reveló gran número de bacterias grampositivas tanto en el líquido ascítico como dentro de los huevos.

2.3.1.1.5 Signos clínicos.

Los principales signos que se evidencian en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) infectados con la bacteria *Carnobacterium maltaromaticum* son externamente; melanosis, exoftalmia bilateral, hemorragias oculares, internamente; petequias en hígado, distensión abdominal, acumulación de líquido ascítico de consistencia viscosa, congestión de la cavidad abdominal y riñón granulomatoso e hipertrofiado (Álvarez *et al*, 1996). Herman *et al*. (1985) reportó que la enfermedad fue en ambos peces de ambos sexos, estos presentaron hemorragias en la base de las aletas, y algunos machos tenían lesiones en la piel e hiperemia. Internamente, muchos peces tuvieron ascitis, palidez hepática, lesiones compatibles con granulomas en riñón y hemorragia del intestino y las gónadas.

2.3.1.1.6. Diagnóstico

Muchas de las enfermedades causadas por bacilos ácido lácticos están relacionados con infecciones crónicas en cultivos de salmónidos con altos niveles de mortalidad, la mayoría de los aislamientos de este patógeno se han hecho a partir de peces adultos estresados, también en la etapa del desove, la baja temperatura está relacionada con la patogenia lo que podría indicarnos que son patógenos oportunistas (Reyes, 2010). Estas bacterias se pueden aislar fácilmente en TSA o agar BHI (Hiu *et al*; 1984;. Herman *et al*, 1985.; Baya *et al.*, 1991). El aislamiento de *Carnobacterium maltaromaticum* se puede realizar a través de la siembra de las muestras en agar TSA (Tripiticasa Soya Agar) y en el medio MRS (Man, Rogosa y Sarpe) específico para *Lactobacillus*, al cual se le puede añadir algunos antibióticos como la fosfomicina y cicloheximida para volverlos más selectivos, incubándose a 30°C por 48 a 72 horas (Reyes, 2010), sin embargo, la mayoría de los autores (Ross y Toth, 1974; Cone, 1982; Hiu *et al*, 1984; Toranzo *et al*, 1993) concuerdan en que las condiciones óptimas para el cultivo del *Carnobacterium maltaromaticum* en agar TSA es de 22 a 25°C por 48 horas.

Para la identificación de las bacterias obtenidas en los medios de cultivo TSA y MRS (Man Rogosa Sharpe) se utilizan pruebas bioquímicas como la tinción de Gram y la prueba de la catalasa, así como para la identificación de los géneros bacterianos de *Carnobacterium spp* también se puede utilizar el Kit API 50 CH, específico para especies de *Lactobacillus* y *Carnobacterium*.

2.3.1.1.7. Patogenia e inmunidad

Lactobacillus piscícola fue el primer *Lactobacillus* aislado de truchas enfermas y después también de otros peces de cultivo, cumpliendo los postulados de Koch. Los aislados de lubina rayada atlántica enferma (*Morone saxatilis*), pero no de pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) o pez gato manchado (*Ictalurus nebulosus*), mataron alevines de trucha arcoíris (*Onchorynchus mykiss*) (LD₅₀ de dos cepas de *Lactobacillus piscícola*, 1.4×10^6 y 2.3×10^6 c.f.u/g, respectivamente), administradas por vía intraperitoneal. Las truchas muertas o en estado portador mostraron serias lesiones de los órganos internos. La lubina rayada atlántica fue resistente, a pesar de que la bacteria inyectada pudo ser reaislada dos semanas después del hígado, como fue el caso con truchas moribundas y muertas. Por lo tanto, parece que existen factores de virulencia específicos desconocidos por cepa y hospederos sensibles y específicos. En general, los peces enfermos contienen infecciones mixtas. Además, las condiciones de estrés tales como la manipulación o desove, causan una predisposición de infección por carnobacteria (Brenner, 2009).

Extraordinariamente, *Carnobacterium piscícola* ha sido aislado de pus humano y una de las cepas investigadas por Collins (1987) ha sido aislada de plasma de sangre humana. Con esto se puede concluir que existe cierta patogenicidad con algunas cepas de *Carnobacterium maltaromaticus* mientras que para los humanos y animales de sangre caliente, las carnobacterias no son patogénicas (Brenner, 2009).

Ross y Toth (1974), Cone (1982), Herman *et al.* (1985), Michel *et al.* (1986) y Baya *et al.* (1991) reportaron dificultad en la transmisión de la enfermedad por vía intraperitoneal post inyección de la bacteria. De cualquier otra vía es necesario o las causas de la enfermedad sólo cuando los animales están estresados o a una

determinada edad. Baya *et al.* (1991) informaron que la DL50 para la trucha arcoíris, fue de $2,0 \times 10^6$ células, mientras que la lubina rayada fue resistente a la bacteria a dosis de $8,0 \times 10^7$. Cada cepa ensayada creó un portador Estado en el riñón de los peces que sobrevivieron la vía intraperitoneal desafío. Esto es cierto tanto para lubina rayada y la trucha arco iris. Toranzo *et al.* (1993) reportaron una cepa del arcoíris truchas que era inusualmente virulenta. Este aislado tenía una $DL50 < 5 \times 10^6$. Asimismo, no hay información disponible sobre la transmisión del *Carnobacterium maltaromaticum*.

2.3.1.1.8. Control y tratamiento

La patogenicidad de cepas de *Carnobacterium maltaromaticus* de peces producidos en acuicultura elevó el interés en la sensibilidad de carnobacterias a las quimioterapias. (Brenner, 2009). Baya *et al.* (1991) encontraron que aislados de este patógeno fueron resistentes a los antibióticos comunes utilizados en la acuicultura, tales como oxitetraciclina, quinolonas, nitrofuranos y sulfonamidas. Michel *et al.* (1986), Baya *et al.* (1991) y Toranzo *et al.* (1993) informaron que sus aislamientos fueron sensibles a eritromicina in vitro.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de Estudio

El muestreo del presente estudio se realizó en el Centro Piscícola el “Ingenio”, cuya fuente de agua es el río Chiapuquio, ubicado en la región Junín a 3452 msnm, en la provincia de Huancayo. El procesamiento de muestras y pruebas bioquímicas se llevaron a cabo en Lima, en el laboratorio de Histología Embriología y Patología Veterinaria, Sección Ictiopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV- UNMSM).

3.2 Material de laboratorio

Para realizar el presente estudio fueron necesarios distintos materiales y equipos que permitan realizar la siembra en placa, tinción Gram y pruebas bioquímicas que se requirieron, éstos fueron proporcionados por la Sección Ictiopatología de la Facultad de Medicina veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (FMV- UNMSM).

3.3 Material biológico

El estudio se realizó utilizando muestras de truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) pre comerciales y comerciales. Se obtuvieron muestras estériles de riñón y bazo con un ansa estéril e inmediatamente se colocó en medio Stuart en una sala especialmente acondicionada para dicho propósito, después se transportaron al laboratorio en Lima. Asimismo, se llevó a cabo la medición de distintos parámetros físico-químicos del agua como son pH, amoníaco, oxígeno disuelto, dureza de carbonatos y fosfatos

3.4. Tamaño Muestral

Se consideraron 60 animales con signos clínicos sugerentes de enfermedad como son: nado lento, aislamiento del cardumen, exoftalmia, melanosis, entre otros. Los

cuales fueron colectados por criterios objetivos para métodos no probabilísticos (De Blas, 2008; OIE, 2012), en los casos en que se requiere el diagnóstico de enfermedades en peces, como éste, lo más adecuado es este tipo de muestreo intencionado.

3.5. Metodología

3.5.1 Evaluación Físico- Química del agua

Se tomaron muestras de agua del estanque donde se encuentra la población de truchas evaluadas el día en que se realizó el muestreo; se utilizó el SERA Aqua-test Box, donde se evaluaron los parámetros de pH, amoníaco, oxígeno disuelto, dureza de carbonatos y fosfatos, buscando encontrar los valores óptimos del agua para la crianza de la trucha arcoíris. La toma de muestra se realizó manualmente mediante el llenado de un frasco a un metro de profundidad respecto a la superficie del agua (espejo de agua) del estanque de cultivo, los procedimientos posteriores fueron según las especificaciones del Kit. Asimismo se evaluó la temperatura mediante el uso de un termómetro ambiental de máxima de mercurio cuyo rango de sensibilidad es de -10 °C a +50°C.

La evaluación de la transparencia del agua fue mediante inspección visual de las pozas y el uso del disco de Secchi el cual fue sumergido hasta el fondo de la poza de donde se obtuvieron los peces del presente estudio. Los valores fueron determinados subjetivamente mediante la siguiente clasificación:

- Transparencia Alta: Se observa fácilmente los contrastes del disco de Ssecchi
- Transparencia Intermedia: Se observa con cierta dificultad los contrastes del disco de Ssechi
- Transparencia Baja: No se observa los contrastes del disco de Ssechi.

Cuadro N° 4: Parámetros físicos y químicos del agua para la crianza comercial de trucha arcoíris.

Características	Rango óptimo
Temperatura (C°)	10-18
Turbidez (mg/L)	< 75
pH	7-8
Oxígeno disuelto (mg/L)	6.5-9
Transparencia	Alta
Nitrógeno Amoniacal (mg/L)	< 0.0012
Nitratos (mg/L)	< 0.01
Dureza (mg/L de CaCO ₃)	60 - 300

Fuente : (Godoy, 2002)

3.5.2 Toma de muestras biológicas

Las truchas pre comerciales y comerciales se obtuvieron de múltiples pozas, estas presentaron por lo menos uno de los signos clínicos mencionados. Luego fueron transportadas en baldes con agua de la misma poza hasta el ambiente designado para realizar la necropsia.

Se identificó y anotó la talla de cada pez, luego se efectuó un cuidadoso examen de la superficie corporal anotándose la presencia de anormalidades visibles macroscópicamente. Se evaluó la homogeneidad de la piel, erosiones, melanosis, dilatación abdominal y posibles anomalías oculares como son exoftalmia e hipema, luego se desinfectó la superficie del pez con alcohol de 70° mediante el uso de una torunda antes de proceder con la necropsia.

La necropsia de los peces colectados se realizó según recomendaciones de la Asociación Médica Veterinaria Americana (AVMA, 2007) y Noga (2010). Se utilizó Eugenol vía baño de inmersión por 3-5 minutos a dosis de 60 mg disuelto en un (1) litro

de agua para reproducir los planos 1 y 2 de la Etapa II de anestesia de los peces el cual se confirmó mediante observación de los signos de pérdida parcial o total del equilibrio, reducción de la ventilación y pérdida del tono muscular. A continuación se procedió a realizar el corte medular con bisturí, entre el cráneo y la médula espinal, y por último se realizó el corte de las branquias para producir desangrado y en consecuencia, la muerte del pez.

Durante el proceso de necropsia se expuso *in situ* las vísceras. Una vez expuestas las branquias y la cavidad celómica, se procedió a efectuar un examen macroscópico de órganos internos para identificar y registrar alguna anomalía o lesión.

3.5.3 Siembra y cultivo bacteriano

Una vez con el riñón y el bazo expuestos, se realizó una incisión estéril de estos, inmediatamente después se obtuvo un hisopado de la zona de corte y se procedió a colocarlos en medio de transporte Stuart. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en un *cooler* y con el uso de “gel pack” se mantuvieron a una temperatura aproximada de 15°C hasta la llegada al laboratorio, donde fueron sembradas en medio TSA e incubadas a 25°C por 48 horas. Las muestras fueron identificadas con las siguientes siglas:

- T: Para todas las muestras haciendo referencia a la especie en estudio.
- R o B: “R” si la muestra es de riñón o “B” si es de bazo.
- Del 1 al 60: Cada individuo fue numerado (total: 60 truchas).

Quedando de la siguiente manera: TB27: sembrado del bazo de la trucha número 27.

3.6 Caracterización de colonias

Pasado el tiempo de incubación se procedió a la selección de las colonias en el medio sembrado, se seleccionaron colonias circulares pequeñas, en el examen microscópico se utilizó tinción Gram evaluándose la forma y tipo de las bacterias. Se seleccionaron las bacterias compatibles con la morfología de colonias sugerentes de

Carnobacterium maltaromaticum, luego se colocaron en un cepario para la conservación de la cepa y realizar las pruebas posteriores.

3.7 Mantenimiento de cepas

Para la conservación de las cepas seleccionadas, cada una se sembró en agar Luria Bertani, las cuales fueron incubados a 25°C por 24-48 horas y guardadas hasta realizar las pruebas bioquímicas posteriores.

3.8 Caracterización bioquímica

Para la identificación de cada bacteria presuntiva aislada, se realizó se llevó a cabo mediante pruebas bioquímicas utilizando un perfil de 17 reacciones, en el perfil bioquímico se evaluó las reacciones de: catalasa, citocromo oxidasa, citrato, motilidad, producción de hidrógeno sulfurado, indol, fermentación de glucosa, manitol, sacarosa, lactosa, metabolismo de la urea, reducción de nitrato, prueba de Rojo de metilo, descarboxilación de lisina, ornitina, arginina y la prueba de Hugh & Leifson, todas las pruebas se incubaron a una temperatura de 25°C por 24 a 48 horas. Todos los medios para las reacciones bioquímicas fueron preparados en el laboratorio según la metodología descrita por Buller (2004) y Brener *et al.* (2005). La lectura de los resultados se realizó hasta las 48 horas después de haber sido sembrado. Pasado ese tiempo se procedió a la obtención de resultados para su posterior análisis, todas las pruebas se repitieron por triplicado para la confirmación de resultados.

IV. RESULTADOS

4.1 Análisis de agua.

Se realizó el análisis Físico Químico del agua, obteniendo los siguientes resultados: la concentración de Nitrógeno amoniacal (0.5 mg/L), y de fosfatos (0.5 mg/L) se encontraron incrementados, la concentración de carbonatos se encontró dentro de los parámetros óptimos, la concentración de oxígeno disuelto (4 mg/L) se encontró por debajo de los niveles óptimos. La transparencia fue intermedia y el pH se encontró levemente elevado. Todos estos valores han sido contrastados con los valores óptimos publicados por Godoy el año 2002 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Parámetros de la calidad de agua. Resultados y valores óptimos.

	Fosfatos mg/L	Nitrógeno Amoniacal mg/L	(Carbonatos) Dureza mg/L	Oxígeno Disuelto mg/L	Transparencia	pH	Temperatura (°C)
Valores encontrados	0.5	0.5	161.1	4	Intermedia	8.5	11.1
Valores óptimos (Godoy, 2004)	0.1	< 0.0012	60 - 300	6.5-9	Alta	7-8	10- 16

4.2 Examen de necropsia.

Al examen de necropsia se evidenciaron lesiones externas como internas en las truchas analizadas.

4.2.1 Lesiones Externas

De los peces muestreados se determinó que del total de lesiones externas las de más alta frecuencia fueron la palidez branquial (Figura 1) 31.6% (19/60), melanosis (Figura 2B) 20% (12/60) y descomposición de aleta caudal (Figura 3) 13.3% (8/60), mientras que escoliosis e hipema se presentaron en una menor frecuencia (8.3% (5/60) y 5% (3/60) respectivamente) (Figura 4). La opacidad ocular, exoftalmia, úlceras en piel y distensión abdominal (Figura 5) fueron las de menor presentación 3.3% (2/60) (Cuadro 6).

Figura 1. Palidez branquial (flechas rojas)



Figura 2. Lesiones en piel.

A: Normal,



B: Melanosis (Flechas azules).



Figura 3. Descomposición de aleta caudal (Flechas rojas).



Figura 4. Hipema (Flecha blanca).

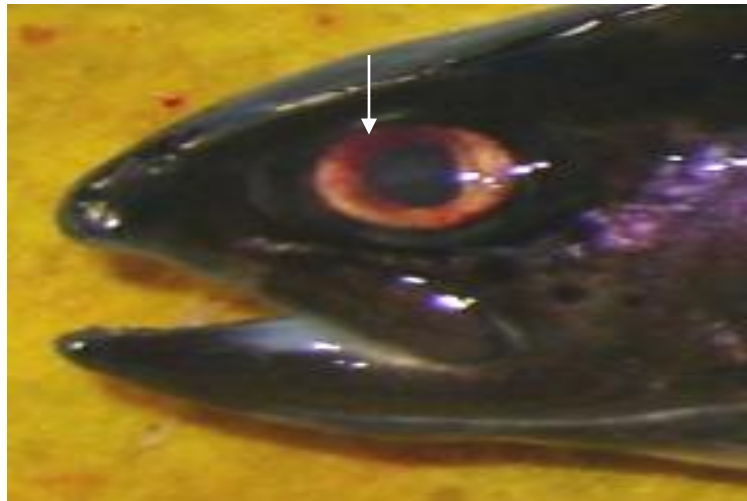
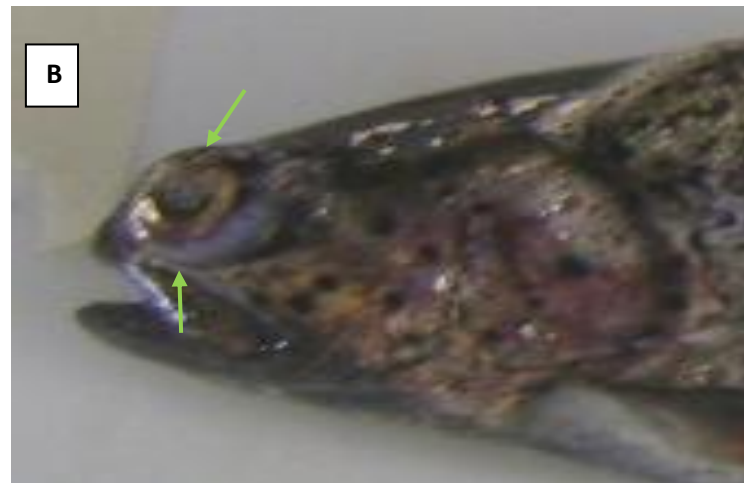


Figura 5.

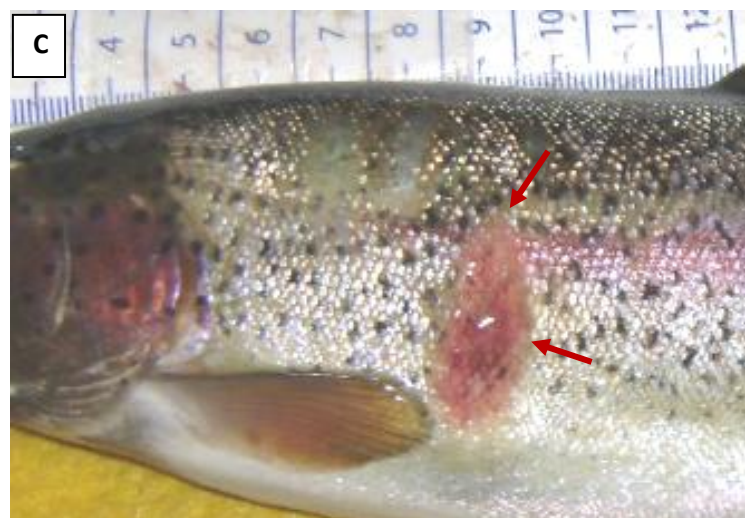
A : Opacidad ocular (Flecha blanca).



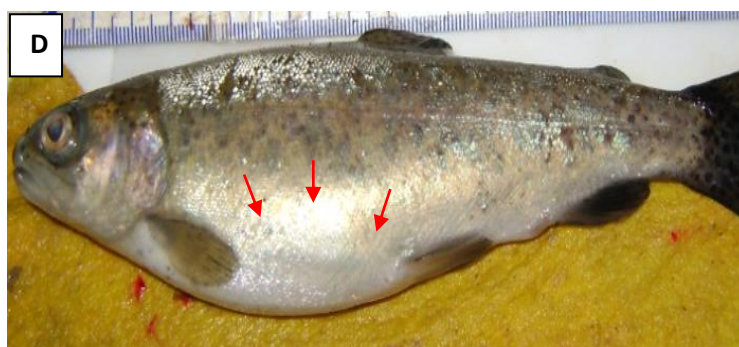
B: Exoftalmia (Flechas verdes).



C: Úlceras en la piel (flechas rojas).



D: Distensión abdominal (Flechas rojas)



Cuadro 6. Lesiones externas halladas en truchas arcoíris.

Total n = 60		
Lesiones externas	Frecuencia	%
Palidez branquial	19/60	31.6 %
Melanosis	12/60	20 %
Descomposición de la aleta caudal	8/60	13.3 %
Escoliosis	5/60	8.3 %
Hipema	3/60	5 %
Exoftalmia	2/60	3.3 %
Úlceras en piel	2/60	3.3 %
Opacidad ocular	2/60	3.3 %
Distensión abdominal	2/60	3.3 %

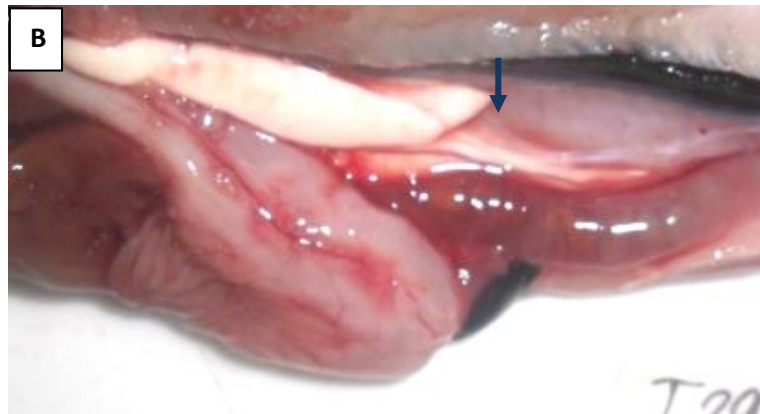
4.2.2 Lesiones internas

En la piscigranja en estudio se observaron diversas lesiones internas siendo las más frecuente la palidez hepática 66.6% (40/60) (Figura 6A), renomegalia (Figura 6C) y atrofia del tejido graso peritoneal se hallaron en un 41.6% (25/60) (Figura 6B), esplenomegalia 40% (24/60) (Figura 6A). Por otro lado, las lesiones con frecuencia menor al 30% fueron la congestión/ dilatación del intestino posterior 26.6% (16/60), congestión de ciegos pilóricos 23.3% (14/60) (Figura 7), distensión estomacal 19.3% (11/60) (Figura 8), hemorragia equimótica del hígado 10% (6/60) (Figura 9), lesiones compatibles con granulomas hepáticos 10% (6/60) (Figura 10A), lesiones compatibles con granulomas renales 6.6% (4/60) (Figura 10B), mientras que la congestión de tejido graso peritoneal (Figura 11A) y hemorragia petequiral en tejido graso peritoneal (Figura 11B) se encontraron en el 5% de individuos (3/60). (Cuadro 7).

Figura 6. A: Palidez hepática (Flecha verde),
Esplenomegalia (Flecha blanca)



B: Atrofia del tejido graso peritoneal (Flecha negra).



C: Renomegalia (Flecha negra).

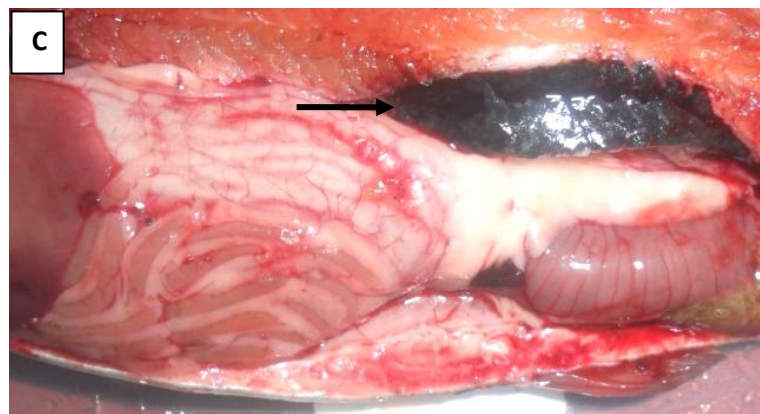


Figura 7

Congestión de ciegos pilóricos (Flechas negras),

Congestión y dilatación del Intestino posterior (Flecha azul),

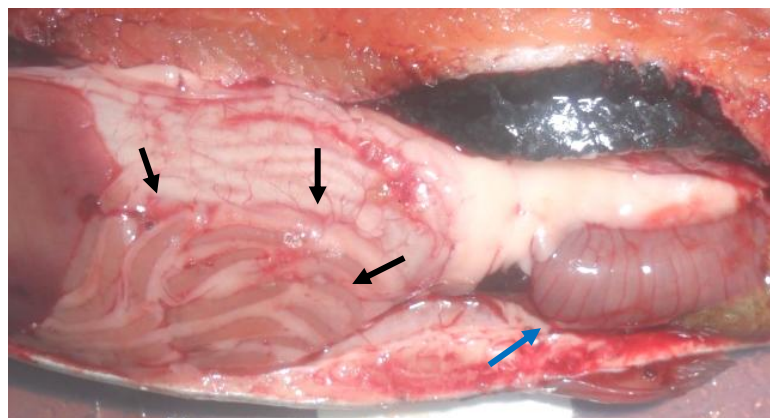


Figura 8. Distensión estomacal (Flechas rojas).

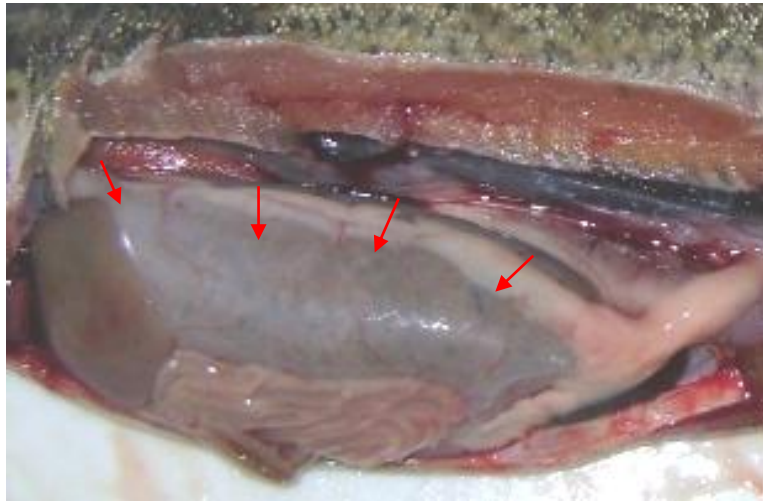


Figura 9. Hemorragias equimóticas en el hígado (Flechas blancas)

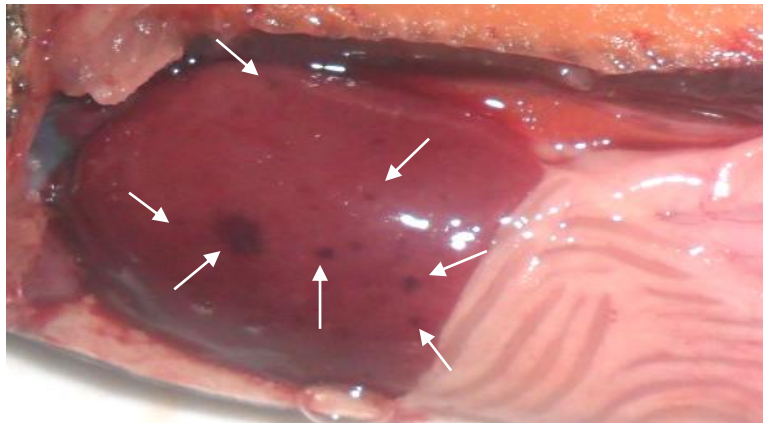
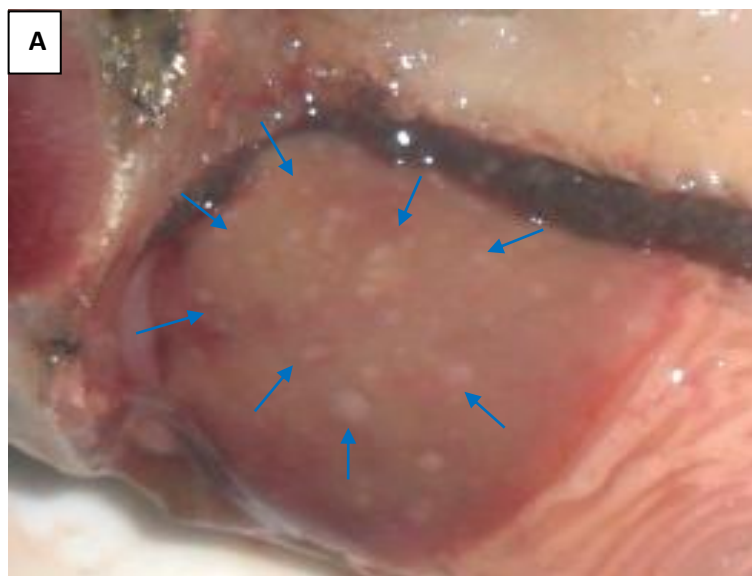


Figura 10. A: Lesiones compatibles con granulomas en Hígado (Flechas azules).



B: Lesiones compatibles con granulomas en riñón (Flechas rojas).

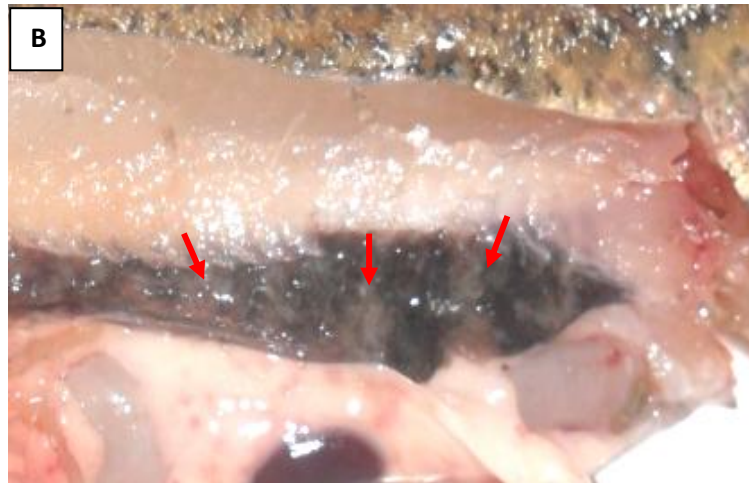
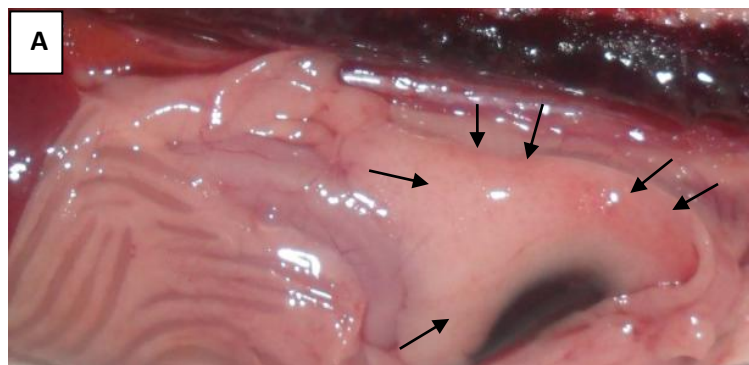
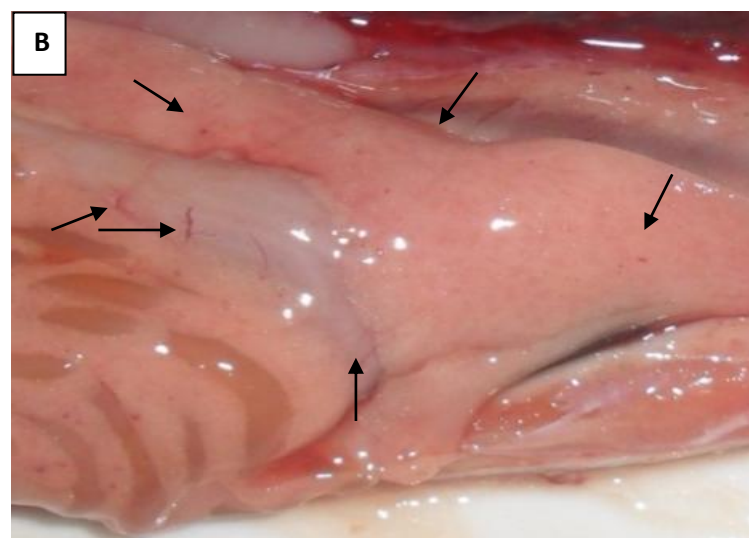


Figura 11. A: Congestión del tejido graso peritoneal (Flechas negras).



B: Hemorragia petequeal en tejido graso peritoneal (Flechas negras).



Cuadro 7. Lesiones/ Hallazgos internos hallados en trucha arcoíris

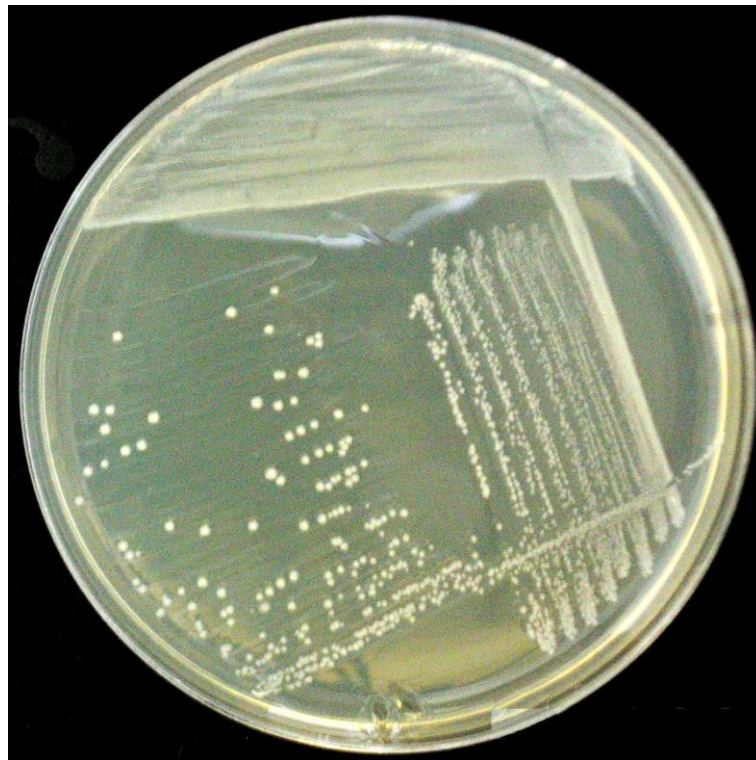
Total n = 60		
Lesiones internas	Frecuencia	%
Palidez hepática	40/60	66.6%
Renomegalia pulposa	25/60	41.6%
Atrofia del tejido graso peritoneal	25/60	41.6%
Esplenomegalia	24/60	40%
Congestión/dilatación intestino posterior	16/60	26.6%
Congestión ciegos pilóricos	14/60	23.3%
Distensión estomacal	11/60	19.3%
Hemorragia equimótica en hígado	6/60	10%
lesiones compatibles con granulomas hepáticos	6/60	10%
lesiones compatibles con granulomas renales	4/60	6.6%
Congestión tejido graso peritoneal	3/60	5%
Hemorragia petequiral en tejido graso peritoneal	2/60	3.3%
Hemorragia petequiral en Ciegos pilóricos	1/60	3.3%

4.3 Análisis Microbiológico

Las muestras de bazo y riñón se cultivaron en agar Trypticase Soya Agar (TSA) he incubaron a una temperatura de 25°C por 48 horas, luego de ese periodo crecieron un total de 48 aislados a los que se le realizó la tinción de Gram obteniéndose 27 colonias grampositivas (56.25%) y 21 gramnegativas (43.75%) (Cuadro 8)

De los 27 aislados grampositivos, se seleccionaron aquellas colonias con características semejantes al *C. maltaromaticum* (pequeñas, brillantes, convexas, enteras y circulares, (Figura 12), y que a su vez presentaron morfología bacilar y resultaron negativas a la prueba de catalasa y oxidasa sin formación de esporas, reduciéndose solo a 7 colonias, algunos presentaron motilidad, y todos metabolizaron la glucosa, lo que los agruparía dentro de la familia Carnobacteriaceae (Collins *et al*, 1987) (Cuadro 9).

Figura 12. Colonias presuntivas de *Carnobacterium sp*



Se realizaron pruebas bioquímicas tales como: rojo de metilo, descarboxilación de la lisina, citrato, motilidad, reducción de nitrato, producción de hidrógeno sulfurado, producción de indol, fermentación de la glucosa, manitol, sacarosa, lactosa, metabolismo de la urea, obteniéndose los siguientes resultados; a la prueba de citrato, indol, degradación de la urea y producción de H₂S todas resultaron negativas, a la fermentación de la glucosa, todas resultaron positivas.

Cinco cepas presentaron motilidad en medio SIM, solo 2 cepas redujeron el nitrato, en relación a la fermentación de azúcares, 4 fermentaron el manitol y la lactosa, y solo hubo una cepa que no fermentó la sacarosa, 5 cepas resultaron positivos a la prueba del rojo de metilo, solo una cepa descarboxiló la lisina y 3 cepas metabolizaron la arginina y la ornitina, solo 4 cepas tuvieron un carácter fermentativo. Finalmente, luego de repetir todas las pruebas bioquímicas tres veces, solo una cepa coincidió con las características fenotípicas para los diferentes sustratos que se han analizado en el presente estudio y que son semejantes al *Carnobacterium maltaromaticum* de la referencia (Cuadro 08).

Cuadro 8. Resultados de las Pruebas Bioquímicas

	TR38	TR8	TB45	TR46	TB15	T15Bb	TR20	Según Buller 2004
Oxidasa	N	N	N	N	N	N	N	N
Catalasa	N	N	N	N	N	N	N	N
Rojo Metilo	P	N	P	P	N	P	P	P
Urea	N	N	N	N	N	N	N	N
Manitol	N	N	N	P	P	P	P	P
Reducción de Nitrato	N	P	N	N	N	N	P	N
Glucosa	P	P	P	P	P	P	P	P
Lactosa	P	N	P	N	N	P	P	40*
Lisina	N	P	N	N	N	N	P	N
Citrato	N	N	N	N	N	N	N	N
Arginina	N	P	N	P	P	N	N	P
Sacarosa	P	N	P	P	P	P	P	P
Indol	N	N	N	N	N	N	N	N
Motilidad	P	N	P	N	P	P	P	N
Producción de H ₂ S	N	N	N	N	N	N	N	N
Ornitina	N	P	P	N	N	N	P	N
Oxidación/ Fermentación	F	O	O	F	O	F	F	F
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>				X				

P: Positivo N: Negativo O: oxidador F: Fermentador *: 40% resultó positivo

X: Positivo a *Carnobacterium maltaromaticum*

V. DISCUSIÓN

En estos últimos años las enfermedades causadas por bacterias grampositivas han aumentado considerablemente en la producción de trucha, siendo esta especie de cultivo una de las más sensibles a este tipo de enfermedades, en gran medida de forma aguda y con mayores tasas de mortalidad (Álvarez *et al.*, 1996; Reyes, 2010).

De los datos obtenidos en la calidad del agua destaca el de la concentración de fosfatos, que está por encima de 0.1 mg/L, la presencia de fosfatos en los niveles registrados estarían relacionados a la eutrofización de las aguas, por el gran crecimiento de algas, o la acumulación de sedimentos que trae como consecuencia la reducción de la concentración del oxígeno disuelto. Esto concuerda con los datos obtenidos que indicaron una concentración de oxígeno por debajo de los valores óptimos lo que genera estrés en los peces y los dispone a ser afectados por diversos patógenos oportunistas (Cánepa de Vargas *et al.*, 2004). Asimismo, también se encontró elevada la concentración de Nitrógeno amoniacal con respecto al rango óptimo (<0.001mg/L). Este incremento responde a la producción de los desechos de amoníaco por parte de los peces y también a la descomposición de cualquier tipo de materia orgánica, como material vegetal, restos de comida o heces. Todas las condiciones que disminuyen la calidad del agua, mencionadas líneas arriba, se evidenciaron fácilmente al momento del muestreo de los peces; el exceso de comida, aunado a su falta de flotabilidad, hacen que parte de ésta precipite y forme parte del sedimento que favorece a la eutrofización del agua, elevando así la concentración del fosfato y disminuyendo la traslucidez de ésta hasta un nivel intermedio como se mostró en el cuadro N° 5. Asimismo, se hizo evidente también la presencia de algas, restos vegetales e incluso peces muertos en las rejillas de salida de agua lo que explica los altos valores de nitrógeno amoniacal contribuyendo aún más a la disminución de la calidad del agua y aumentando la susceptibilidad de los peces a patologías diversas.

La pobre calidad de agua y los deficientes planes sanitarios, han hecho posible que en estudios anteriores en piscigranjas pertenecientes a la cuenca del río Mantaro, se hayan reportado la presencia de múltiples enfermedades producidas por agentes infecciosos bacterianos, tales como *Yersinia ruckeri* (Sierralta, 2011; Bueno, 2012), *Flavobacterium psychrophilum* (León, 2008), fúngicas como el hongo sistémico *Ictiophonus hoferi* (Rosenthal, 2007); además de enfermedades de origen metabólico (Chávez, 2008) y la enfermedad bacteriana de riñón (BKD) (Talavera, 2008; Arauco, 2010).

Asímismo, Fernández (2012) aisló colonias provenientes de muestras estériles de riñón y bazo, donde el 12.5% (4/32) pertenecían a bacterias grampositivas; a su vez, Baca (2012) aisló también colonias provenientes de muestras estériles de los mismos órganos, donde un 33.3% (7/21) pertenecían a colonias Gram positivas. Ambos autores obtuvieron estos resultados de truchas arcoíris pre comerciales provenientes de la cuenca del Mantaro. Ellos reportaron la presencia de granulomas a nivel de bazo y riñón, y las conclusiones de sus respectivos estudios afirman que estas lesiones estarían asociadas a la presencia de estas bacterias grampositivas o al *Ictiophonus sp.*, y que deberían realizarse estudios para descartar e identificar al agente o agentes patógenos causantes de estas lesiones.

En trabajos realizados por Janampa (2012), se determinó mediante PCR la ausencia de la bacteria *Renibacterium salmoninarum* en esta misma piscigranja, en dicho estudio el autor encontró diversos tipos de lesiones como granulomas en el riñón que podrían deberse a otros agentes de etiología bacteriana, sin embargo no se identificó a los agentes causantes de dichas lesiones por no ser el objetivo del estudio. El presente estudio, luego de los procesos selectivos (morfológicos y bioquímicos) de los aislados y en comparación con los resultados bioquímicos reportados por distintos autores (Collins 1987; Buller 2004; Brenner *et al* 2005), determinó que siete de los aislados grampositivos pertenecían a la familia Carnobacteriaceae. Además el presente estudio, se complementa con las investigaciones de los autores detallados líneas arriba, puesto que en esta oportunidad sí se determinó el agente causal de las lesiones compatibles con granulomas en el riñón, pues mediante las características fenotípicas realizadas al aislado TR46 se identificó como *Carnobacterium maltaromaticum* (ver cuadro 10), la cual fue aislada de la trucha que presentó lesiones compatibles con granulomas en riñón

(Fig. 10B), lo que nos indicaría la relación lesión – agente, también determinada por Álvarez *et al.*, (1996) en truchas arcoíris cultivadas en piscigranjas venezolanas donde se observó la misma relación. Esta bacteria podría también haber sido la causante de las lesiones reportadas por Fernández, Baca y Jananpa (2012) en las truchas arcoíris de la cuenca del Mantaro.

En el presente estudio, se evidenciaron macroscópicamente lesiones compatibles con granulomas en riñón y bazo de peces afectados, hemorragias en diferentes tejidos como petequias en hígado además de signos externos como melanosis, exoftalmia y palidez hepática, que en conjunto, corresponden también a las descritas por Álvarez *et al.* (1996) en un estudio realizado en una piscigranja que presentó alta mortalidad en truchas arcoíris comerciales en el estado de Mérida- Venezuela, el autor intentó aislar el patógeno *Renibacterium salmoninarum*, agente causal de la enfermedad bacteriana del riñón (BKD) que induce a la formación de granulomas en este órgano, sin embargo, en dichos aislamientos no se encontró *R. salmoninarum*, descubriendo cepas de lactobacilos atípicos que luego de su identificación bioquímica, se determinó que pertenecían al *Carnobacterium maltaromaticum*, indicándose como nuevo patógeno que está presente en las piscigranjas de truchas arco iris y que es capaz de producir mortalidades tan elevadas, llegando incluso al 100% como sucedió en esa piscigranja. Por otro lado Starliper *et al* (1992) realizó estudios en salmónidos del atlántico (EE.UU.) concluyendo que los aislamientos de estos organismos se realizaron, en su mayoría, luego de que los peces son sometidos a condiciones de estrés. Este hecho indicaría que el *Carnobacterium maltaromaticum* es un patógeno oportunista; lo que coincide con lo descrito en el presente estudio, que afirma que este agente es el causante de producir las lesiones descritas cuando confluyen, un manejo productivo inadecuado, falta de planes sanitarios y deficiente calidad de agua que predispone a los peces a múltiples infecciones primarias y, como en este caso, oportunistas, que traen a corto o largo plazo, importantes implicancias económicas.

En el presente estudio, se observaron además varias lesiones internas así como externas, que podrían estar relacionados al manejo sanitario y productivo de dicha piscigranja. Así, la melanosis es una respuesta común a la enfermedad en los salmónidos, donde los peces enfermos suelen ser más oscuros de lo normal debido a la

sobreproducción de melanina en la piel que está bajo control neuroendocrino y se ve afectado por las hormonas, como la adrenalina (hormona del estrés) (Noga, 2005). Se encontraron además lesiones oculares como exoftalmia, hipema y opacidad ocular los cuales son reconocidos como signos clínicos generales al alterarse la salud de los peces, pudiendo indicar también una posible causa traumática, así como deficiencias nutricionales asociadas con patología ocular (Noga, 2010). Por otro lado, se observó distensión abdominal que podría estar asociada a la retención de alimento no digerido y líquido mucoso. La presencia de esplenomegalia podría estar causada por alteraciones hematológicas o también como respuesta a infecciones generalizadas (Ellis *et al*, 2004), sin embargo, la coexistencia de todas las lesiones descritas, concuerdan también con las reportadas por Toranzo *et al* (1993) y Evelyn *et al* (1998) en psicigranjas en España y Canadá respectivamente, como lesiones causadas por el *C. maltaromaticum* en truchas arcoíris en etapa comercial, es decir, con la misma edad que las muestreadas en el presente estudio.

La presencia de palidez hepática está asociada a lipidosis hepática, lo que podría deberse a alteraciones metabólicas por el exceso de energía (Noga, 2010), alimentación inadecuada (en exceso), propios de los sistemas de cultivo semi-intensivo e intensivo, tal y como lo demostró Chávez (2008) en truchas arcoíris comerciales de esta misma cuenca, donde determinó lesiones compatibles con alteraciones metabólicas relacionadas al exceso de proteína como la degeneración grasa por desbalance de energía, en el hígado del 97.5% de los individuos muestreados.

La coexistencia de múltiples infecciones (ya sean clínicas o subclínicas), aunadas a la baja calidad de agua, reportado en este estudio, y el deficiente manejo sanitario y alimenticio en las diferentes etapas de la producción, se convierten en factores que estresan más aún la ya exigente crianza intensiva, al correlacionar estos datos, no resulta difícil entender el porqué de la alta incidencia de las lesiones internas y externas encontradas en las necropsias. Todo esto conlleva no solo a la proliferación de enfermedades primarias, sino también desarrollo de bacterias oportunistas como la identificada en este estudio. El *Carnobacterium maltaromaticum* agrava y altera la salud de las truchas de dichos criaderos, produciendo granulomas en riñón y pudiendo

causar también mortalidades importantes. En concordancia con lo reportado por Toranzo *et al* (1993), que estudió un brote de *C. Psicicola* en etapa comercial (250 g.) que representó un 25% de mortalidad y que se debió, aparentemente, a un repentino aumento de temperatura del agua (de 17 a 22°C), fortaleciendo la postura de que cambios en la calidad de agua, entre otras deficiencias, podrían desencadenar en lesiones causadas por el *Carnobacterium maltaromaticum*.

Finalmente, las colonias provenientes de los aislados de bazo y riñón del presente estudio, que fueron seleccionadas por morfología, presentaron características similares a las reportadas por Collins (1987), Álvarez (1996) y Toranzo (1997), siendo estas pequeñas (aprox. 2 mm), blancas, convexas y circulares. La selección de los bacilos cortos, grampositivos, sometidos a 17 pruebas bioquímicas por triplicado correspondieron a los descritos por Buller (2004), donde se confirma la identificación del agente aislado como *C. maltaromaticum* a la colonia de la muestra TR46 correspondiente a uno de los individuos que presentó lesiones compatibles con granulomas en el riñón.

Los resultados obtenidos en la presente investigación deben ser tomados en cuenta como parte del historial clínico para llegar a un diagnóstico certero, ya que es la primera vez que se aísla a este patógeno que estaría relacionado con los problemas sanitarios producidos en dicha piscigranja.

VI. CONCLUSIONES

- Se determinó la presencia de *Carnobacterium maltaromaticum* como agente patógeno en el centro piscícola “El Ingenio” de la provincia de Concepción.
- Existen, además del *Carnobacterium maltaromaticum*, otros agentes patógenos pertenecientes a la familia *Carnobacteriaceae*, que están implicados en la alteración de la salud de las truchas arcoíris, y que requerirán estudios posteriores para su identificación.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda la realización de pruebas moleculares como el PCR, para la confirmación genotípica del *Carnobacterium maltaromaticum* como agente patógeno en el centro piscícola “El Ingenio” de la provincia de Concepción.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. ADEX. Asociación de Exportadores 2008. Boletín del sector pesca y acuicultura. Lima. 8 p.
2. AVMA. American Veterinary Medical Association. Guidelines on Euthanasia. Formerly the Report of the AVMA Panel on Euthanasia. 20 p.
3. Álvarez, J. D., Austin B., Reyes N. FONAIAP DIVULGA No. 53 1996. Un nuevo patógeno afecta los cultivos de trucha arco iris en los Andes venezolanos
4. Arauco D, 2010. Estandarización y validación de PCR en tiempo real para la enfermedad bacteriana renal (BKD) en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Tesis para optar el título MV. Lima Perú: Universidad Nacional mayor de San Marcos. Fac Med Vet-130 p.
5. Baca R. 2012. Aislamiento e identificación bioquímica de *Aeromonas salmonicida* en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en fase juvenil en una piscigranja de la región Junín. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 61p.
6. Baya, A.M., Toranzo, A.E., Lupiani, B., Li, T., Roberson, B.S. and Hetrick, F.M. 1991. Biochemical and serological characterization of *Carnobacterium* spp. isolated from farmed and natural populations of striped bass and catfish. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 3114-3120.
7. Bocek A. 2007. Acuicultura. Subsecretaria de Actividades Pesqueras y Desarrollo de Delta Ministerio de Asuntos Agrarios de Buenos Aires. Argentina. 5p.
8. Behnke, R. J. 1966. Relationships of the far eastern trout, *Salmo mykiss* Walbaum. *Copeia* 1966: 346 p.

9. Brenner Don J., Krieg N. R., Staley James T., Garrity George M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Springer. 2009, two (The Proteobacteria), Part B.
10. Bueno H. 2012. Caracterización Fenotípica y Molecular de Cepas de *Yersinia Ruckeri* Aisladas de *Oncorhynchus Mykiss*, del Centro Piscícola “El Ingenio” – Huancayo. Tesis de Biólogo . Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 73p.
11. Buller, NB, 2004. Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals A Practical Identification Manual. Department of Agriculture South Perth Western Australia.
12. Cánepa de Vargas L, Maldonado V, Aurazo M, CEPIS; OPS. Tratamiento de agua para consumo humano. Plantas de filtración rápida. Manual I: teoría. Tomo I. Lima, CEPIS, 2004, p.2-56.
13. Collins MD, Farrow JE, Phillips BA, Kandler O. 1983. *Streptococcus garvieae* and *Streptococcus plantarum* sp. nov. J. Gen. Microbiol. 129: 3427-3431
14. Collins, M. D., Farrow, A. E., Phillips, B. A., Ferusu, S. & Jones, D. (1987). Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. Int J Syst Bacteriol 37, 310–316.
15. Cone, D.K. (1982) A *Lactobacillus* sp. from diseased female rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Newfoundland, Canada. *Journal of Fish Diseases* 5, 479-485.
16. De Blas I. 2008. Estudio de la enfermedad en poblaciones acuáticas: Epidemiología Acuática. Seminario sobre agrupaciones de defensa sanitaria en piscicultura marina. Facultad de veterinaria. Universidad de Zaragoza.
17. Evelyn TPT, Kent ML, Poppe TT, and Bustos P. 1998. Diseases of Seawater Netpen-Reared Salmonid Fishes. Quadra Printers Ltd. Nanaimo. British Columbia. Canada. 138p.

18. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura -Departamento de Pesca y Acuicultura 2010. Estado mundial de la pesca y la acuicultura 2010. p 23-26
19. FAO Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2012. Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2008. Roma: FAO. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO. 218 p.
20. Ferguson H. 2006. Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and their Responses in Disease. 2da ed. Scotian Press. London. 368 p.
21. Franzmann, P. D., Höpfel, P., Weiss, N. & Tindall, B. J. 1991. Psychrotrophic, lactic acid-producing bacteria from anoxic waters in Ace Lake, Antarctica; *Carnobacterium funditum* sp. nov. and *Carnobacterium alterfunditum* sp. nov. Arch Microbiol 156, 255–262.
22. Godoy M. 2002. Truchicultura. 2da edición. Perú: Editorial Perú Impreso. 247p.
23. Hiu, S. F., Holt, R. A., Sriranganathan, N., Seidler, R. J. & Freyer, J. L. (1984). *Lactobacillus piscicola*, a new species from salmonid fish. Int J Syst Bacteriol 34, 393–400.
24. Hibiya, T. 1982. An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features. Kodansha Tokyo.
25. Holzapfel, W. H. & Gerber, E. S. 1983. *Lactobacillus divergens* sp. nov., a new heterofermentative Lactobacillus species producing L(+)-lactate. Syst Appl Microbiol 4, 522–534.
26. Iregui A. 2008. Morfología de los peces. Memorias II Curso Seminario Internacional de Ictiología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. P: 277- 310.

27. Janampa P. 2012. Efecto del periodo de lluvias y estiaje (seca) sobre la prevalencia de *Renibacterium salmoninarum* en truchas arcoiris (*oncorhynchus mykiss*) en una piscigranja del valle del Mantaro Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 73p.
28. León, J. Avalos, R. y Ponce M. 2009. *Flavobacterium psychrophilum* y su patología en alevines de *Onchorhynchus mykiss* del centro piscícola El Ingenio, Huancayo. *Rev. peruana biología*. 15(2): 117- 124.
29. Michel, C, Faivre, B. y Kerouault, B. (1986b) Biochemical identification of *Lactobacillus piscicola* strains from France and Belgium. *Diseases of Aquatic Organisms* 2, 27-30.
30. Mora, D., Scarpellini, M., Franzetti, L., Columbo, S. and Galli, A. (2003) Reclassification of *Lactobacillus maltaromicus* (Miller et al. 1974) DSM 20342T and DSM 20344 and *Carnobacterium piscicola* (Collins et al. 1987) DSM 20730T and DSM 20722 as *Carnobacterium maltaromaticum* comb.nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 675–678.
31. [PRODUCE]. Ministerio de la Producción. 2010. Elaboración de estudio de mercado de la trucha en Arequipa, Cusco, Lima, Huancayo y Puno. 6 p.
32. [PRODUCE]. Ministerio de la Producción. 2011. Valor de la exportación de los productos hidrobiológicos.
33. Reyes HL. 2010. Análisis Del Efecto Antagónico de los probióticos Comerciales *Lactobacillus Plantarum*, *Lactobacillus Casei* y de los antibióticos oxitetraciclina, amoxicilina y eritromicina para el control de la bacteria patógena *Carnobacterium Piscícola* aislada del Intestino de La trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*). Escuela Politécnica Del Ejército Facultad De Ciencias Aplicadas Ingeniería En Biotecnología.

34. Roberts RJ. 1981. Patología de los peces. 1ra edición. España: Ediciones Mundi-Prensa. 366 p.
35. Roberts, R. J., and C. J. Shepherd. 1974. Handbook of trout and salmon diseases. Fishing News Books Ltd., Surrey, England. 168 p.
36. Rodriguez AF, GOMEZ JC Y Mohamad JR Jimenes LM y Rbial SV. 2004 Tratado de Histología veterinaria. Gásquez. Editorial Masson. Barcelona. P: 281-293.
37. Schmidtke, L.M. and Carson, J. (1994) Characteristics of *Vagococcus salmoninarum* isolated from diseased salmonid fish. *Journal of Applied Bacteriology* 11, 229-236.
38. Shaw, B. G. & Harding, C. D. (1985). Atypical lactobacilli from vacuum-packaged meats: comparison by DNA hybridization, cell composition and biochemical tests with a description of *Lactobacillus carnis* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 6, 291–297.
39. Starliper, C.E., Shotts, E.B. and Brown, J. (1992) Isolation of *Carnobacterium piscicola* and an unidentified Gram-positive bacillus from sexually mature and post-spawning rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Diseases of Aquatic Organisms* 13, 181-187.
40. Talavera L A. 2008. Determinación de Presencia de *Renibacterium salmoninarum* y caracterización renal de lesiones histopatológicas presentes en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en crianza comercial. Tesis para optar el título de MV Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos FacMedVet. 100 p
41. Toranzo AE, Romalde JL, Nunez S, Figueras A, Barja JL (1993). An epizootic in farmed, market-size rainbow trout in Spain caused by a strain of *Carnobacterium piscicola* of unusual virulence. *Dis Aquat Org* 17:87-99.

42. Toranzo AE, Cutrin JM, Romalde L, Nunez S, Barja JL (1997) Antigenic characterization of Enterococcus strains pathogenic for turbot and their relationship with other Gram positive bacteria. Dis Aquat Org 21 :187-191
43. Vendrell D, Balcazar JL, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Girones O, Muzquiz JL. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: A review. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 29: 177-198.
44. Wood, B. J. B., Holzapfel, W. H. (1995). The genera of lactic acid bacteria. 1a ed. Ed. Blackie Academic & professional vol. 2. pp:1-12, 320-324.

VIII. ANEXOS

8.1 Pruebas Bioquímicas

A. PRESENCIA DE OXIDASA

La prueba se basa en comprobar la existencia de proteínas citocromo c que forman parte de algunas cadenas transportadoras de electrones propias del metabolismo respirador. La presencia de citocromo c se manifiesta por la capacidad del colorante tetrametil-pfenilendiamina de oxidarse al ceder electrones al citocromo c, apareciendo una coloración azul (forma oxidada).

B. PRUEBA DE LA CATALASA

En los ambientes acuosos, que contienen oxígeno disuelto, como el citoplasma de las células, aparecen formas tóxicas derivadas del oxígeno. Las bacterias que viven en ambientes aerobios necesitan un equipo enzimático capaz de neutralizar estas formas tóxicas. Entre estas enzimas se encuentra la catalasa, que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular.

C. PRUEBA DEL INDOL

Esta prueba se emplea para detectar la presencia de la enzima triptofanasa en las bacterias. Esta enzima degrada el aminoácido triptófano a indol, compuesto que se determina en el ensayo. Para realizar esta prueba, la bacteria se cultiva en un caldo de triptona con NaCl al 0,5 % (medio especialmente rico en triptófano). Si la bacteria tiene la enzima triptofanasa, al añadir al medio el reactivo de Kovacks, este formará un complejo con el indol y se producirá un anillo de color rojo en la superficie del caldo y la prueba será considerada positiva.

D. PRUEBAS DEL ROJO DE METILO (RM) Y VOGES-PROSKAUER (VP)

Las bacterias que en anaerobiosis fermentan los azúcares pueden realizar esto por distintas rutas. Las enterobacterias son anaerobios facultativos que utilizarán la glucosa en dos fases: primero la metabolizarán aerobiamente, consumiendo rápidamente el oxígeno del medio, para, en segundo lugar, continuar metabolizándola por vía anaerobia (fermentación). Esta fermentación puede ser de dos tipos:

a. Fermentación ácido-mixta. Los productos finales son ácidos orgánicos (fórmico, acético, láctico y succínico) y etanol. Fermentación característica de los géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Yersinia*.

b. Fermentación butilén-glicólica. Los productos finales son compuestos neutros como el butanodiol y el etanol, produciéndose acetoina como intermediario. Fermentación característica de los géneros *Enterobacter*, *Serratia* y la mayoría de especies *Erwinia*. La liberación de ácidos orgánicos en el primer tipo de fermentación (ácido-mixta) generará un acusado descenso del pH que podrá ser detectado añadiendo al medio un indicador de pH como el rojo de metilo (rojo a pH de alrededor 4,0). Si la fermentación que se ha llevado a cabo es del tipo butilén glicólica, la producción de acetoina puede ser detectada añadiendo al medio KOH y alfa-naftol (prueba Voges-Proskauer) que reaccionará con este compuesto produciendo un color rojo característico.

E. AGAR CITRATO DE SIMMONS

Este medio indica la capacidad de las bacterias de metabolizar el citrato. Contiene citrato como única fuente de carbono, fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno y azul de bromotimol como indicador de pH. Únicamente las bacterias capaces de metabolizar el citrato (indica presencia de la enzima citrato permeasa) podrán multiplicarse en este medio y, al hacerlo, utilizarán los fosfatos presentes liberando iones amonio. Estos iones

amonio que evolucionan a amoníaco, junto con la eliminación del citrato (ácido), generará una fuerte basificación del medio que se manifestará por un cambio de color del indicador de pH, de verde a azul.

F. AGAR SIM

En AGAR SIM se determina la capacidad de un microorganismo de moverse (presencia de flagelos), de producir INDOL y H₂S. El INDOL es uno de los productos del metabolismo del aminoácido TRIPTOFANO. Las bacterias que poseen la enzima TRIPTOFANASA son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. El indol se puede detectar en un medio adecuado observando el desarrollo de un color rojo después de agregar el reactivo de Erlich o de Kovacs indicando una prueba POSITIVA, debido a que el indol reacciona con el grupo aldehído del p- dimetilaminobenzaldehído. Si el color es amarillo indica una prueba NEGATIVA. EL SIM es un medio semisólido sin hidratos de carbono que inhiban la producción de H₂S y tiene TIOSULFATO DE SODIO fuente de azufre y HIERRO PEPTONADO como indicador de H₂S, lo que lo hace más sensible en la detección de H₂S por producción de un precipitado negro de sulfuro ferroso. La MOVILIDAD BACTERIANA es otra característica importante en la identificación final de especie, se realiza en medios semisólidos como el SIM, debiéndose leer antes que la prueba de indol porque al agregar el reactivo de Erlich ésta se puede enmascarar. La prueba de motilidad se interpreta realizando un cuidadoso examen macroscópico del medio para observar una zona de desarrollo difuso que parte de la línea de inoculación.

G. GLUCOSA, LACTOSA, SACAROSA y MANITOL.

Determinar si una bacteria FERMENTA o no éstos hidratos de carbono. Con o sin producción de gas. Algunas bacterias pueden metabolizar (fermentar) diversos hidratos de carbono con producción de ácido,

anaeróbicamente. El indicador de pH es el ROJO DE FENOL que en acidez vira al color amarillo y en alcalinidad al color rojo.

H. AGAR UREA

En el agar UREA se determina la capacidad de un microorganismo de producir UREASA y desdoblar la urea, formando 2 moléculas de amoníaco. El sustrato urea es una diamina del ácido carbónico, denominada carbamida. Todas las amidas ($\text{RCO}-\text{NH}_2$) son rápidamente hidrolizadas. La hidrólisis de la urea es catalizada por una enzima específica que es la ureasa es una enzima microbiana importante, relacionada con la descomposición de los compuestos orgánicos. Las enzimas bacterianas se clasifican en adaptativas o constitutivas. Una enzima adaptativa o inducida es aquella que es producida por una bacteria solamente cuando se encuentra presente su sustrato específico. La ureasa es una enzima constitutiva ya que la sintetizan ciertas bacterias sin tener en cuenta si hay o no el sustrato urea. El indicador de PH es rojo de fenol, el cual en alcalinidad vira a un color violeta indicando una prueba positiva. Si el color es amarillo indica una prueba negativa.

I. AGAR LIA

En agar LIA se determina la capacidad de un microorganismo para atacar el aminoácido LISINA descarboxilándolo o desaminándolo, la fermentación de glucosa, la producción o no de gases (CO_2), junto con la producción o no de ácido sulfhídrico (H_2S). Se lee un quebrado, la reacción ocurrida en la superficie del medio corresponde al numerador (parte aerobia) y la reacción ocurrida en la profundidad del medio corresponde al denominador (parte anaerobia). La acidez se denomina con la letra A (color amarillo) y la alcalinidad con la letra K (color púrpura). El indicador del PH del medio es PÚRPURA DE BROMOCRESOL, el cual en acidez vira al color amarillo y en alcalinidad al color púrpura. Por contener pequeña cantidad de Glucosa (1 g/ L) al ser fermentada al fondo del tubo es amarillo y la superficie alcalina.

Muchas bacterias poseen descarboxilasas que atacan el aminoácido lisina, con liberación de aminas de reacción alcalina y con producción de CO₂. Para que actúen las descarboxilasas se requiere PH ácido que se obtiene por la fermentación de la glucosa que tiene el medio. La desaminación de la lisina es un proceso oxidativo que se manifiesta por la aparición de color rojo en el tendido, siendo el fondo del tubo amarillo por fermentación de la glucosa que posee el medio. Tiene como fuente de azufre el TIOSULFATO DE SODIO, necesario para las bacterias puedan producir H₂S y como indicador H₂S, CITRATO FERRICO DE AMONIO el cual reacciona con el H₂S produciendo un precipitado negro e insoluble de sulfato ferroso. Para que se produzca H₂S se requiere de un medio ácido por lo que dicha producción generalmente está limitada al fondo del medio, razón por la cual un fondo negro debe leerse como A (ácido), aunque el color amarillo usual esté tapado por color negro.

J. GELATINA NUTRITIVA

Este medio se utiliza para determinar la licuefacción de la gelatina y ver la capacidad de un organismo de producir enzimas de tipo proteolítico (gelatinasas) que licuan la gelatina. Las proteínas que se producen naturalmente son demasiado grandes para entrar en una célula bacteriana; por lo tanto, para que una célula utilice las proteínas, primero deben ser catabolizadas en componentes más pequeños. Las enzimas exonucleares de tipo protelítico, gelatinasas, son secretadas por ciertas bacterias para desdoblar a las proteínas y esta capacidad ayuda a la identificación bacteriana.

K. PRUEBA DE REDUCCIÓN DE NITRATOS

Determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en nitritos o en nitrógeno libre. La reducción de nitrato en nitrito y en gas nitrógeno tiene lugar generalmente en condiciones anaerobias, en las cuales un organismo obtiene su oxígeno del nitrato. El oxígeno sirve como un aceptor

de hidrógeno. La reducción de nitrato en nitrito está indicada por la aparición de color cuando el nitrito reacciona con los dos reactivos. La reacción de color resultante se debe a la formación de un compuesto diazoico, p-sulfobenceno-azoalfa- naftilamina.

Reactivos adicionales

- Alfa - naftilamina 0.05 %
- Ácido sulfanilico 0.8 %

Adicionar directamente al tubo de reacción en el siguiente orden:

1. Alfa - naftilamina 1 ml.
2. Ácido sulfanilico 1 ml.

Guardar ambos reactivos en el refrigerador mientras no se usen. Por lo general se mantienen estables durante tres meses.

L. HIDRÓLISIS DE LA ESCULINA

La hidrólisis de la esculina se determinó según Cowan & Steel's (1993). Para ello los aislamientos bacterianos son inoculados en Caldo Esculina. La esculina y el hierro se disuelven en el agua de peptona y se esteriliza a 115 °C durante 15 min. De forma general la hidrólisis de la esculina libera glucosa y esculetina y esta última se detecta porque reacciona con el ión férrico del medio dando unos precipitados negros que lo oscurecen.

M. HIDRÓLISIS DEL DNA

Los biotipos bacterianos se siembran en un agar que contiene DNA. Las bacterias que son capaces de producir DNasa despolimerizan el DNA hasta fragmentos de nucleótidos. La visualización de la despolimerización del DNA se consigue añadiendo HCl 1N sobre el microorganismo desarrollado en el medio de cultivo que contiene el DNA. El HCl precipita el DNA dando lugar a un enturbiamiento del agar. De esta manera, en las zonas donde el DNA se ha degradado no habrá precipitación y el agar queda transparente debido a que el HCl no reacciona con los fragmentos de nucleótidos. Las cepas bacterianas

objeto de estudio han sido sembradas mediante una estría central gruesa en una placa Petri con agar DNA.